



*“ESTUDIO GENÉTICO DE LA MUERTE SÚBITA
CARDÍACA: MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA
FAMILIAR Y SÍNDROME DE QT LARGO”.*

Catarina Allegue Toscano
Facultad de Medicina
Universidade de Santiago de Compostela,
Julio, 2010

El Doctor Ángel Carracedo Álvarez, Catedrático de Medicina Legal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela, la Doctora *María Brión Martínez*, investigadora del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS),

CERTIFICAN

Que la presente memoria, que lleva por título “**ESTUDIO GENÉTICO DE LA MUERTE SÚBITA CARDÍACA: MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA FAMILIAR Y SÍNDROME DE QT LARGO**”, de la licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad SEK de Segovia, *Catarina Allegue Toscano*, ha sido realizada bajo nuestra dirección, considerándola en condiciones para optar al Grado de Doctor y autorizándola para su presentación ante el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos la presente en Santiago de Compostela, a 19 de julio del 2010.

Fdo: Prof. Ángel Carracedo Álvarez.

Fdo: Dra. María Brión Martínez.

Fdo: Dña. Catarina Allegue Toscano

AGRADECIMIENTOS

Cuando hace ya más de seis años, recién licenciada, escribí en *google* “Ángel Carracedo” me paralicé y estuve a punto de no asistir a la entrevista del día siguiente. Finalmente, me armé de valor y acudí a Santiago. La conversación con él fue muy agradable y al final de esa mañana ya estaba sentada en el aula 1 de docencia en una charla con todo su grupo. Esa tarde conocí el laboratorio en el que el lunes estaría empezando a leer artículos. Desde entonces hasta hoy sólo tengo palabras de agradecimiento para Ángel por darme la oportunidad de haber podido disfrutar aprendiendo y formándome en este mundo de la genética y con tecnología puntera en el campo. Y no sólo eso, le agradezco haber podido absorber conocimientos en campos diversos de la genética clínica y forense gracias a la gran preparación del equipo humano que ha formado.

Agradezco que la oportunidad de formar parte de este grupo haya sido a través de un proyecto dirigido por María Brión. Un proyecto apasionante desde el principio y que María dirige, incansable y meticulosa. Le doy las gracias por su dedicación, preocupación y paciencia... en fin, por haberme mimado tanto. Trabajar con ella ha sido y es un privilegio.

También debo recordar a todos los centros hospitalarios e institutos de medicina legal que han colaborado en el proyecto enviándonos muestras, historias clínicas e informes forenses. A los pacientes y a las familias que han dado su consentimiento para llevar a cabo el proyecto, todo mi agradecimiento.

Y, cómo no, al Centro Nacional de Genotipado y a la Fundación Pedro Barrié de la Maza por la financiación durante esta etapa.

Durante estos años se ha ido formando el “grupo de cardio”: la primera incorporación fue Rocío, que trabaja hasta que haga falta para que las cosas salgan, y le salen perfectas; después llegaron Álex, el doctor y “*apañero*”, que contagia su calma al grupo y Montse, “*la peque*”, con energía para comerse el mundo y a la que deseo la mejor de las suertes en su etapa de tesis. Un grupo de lujo al que agradezco su capacidad de trabajo, trabajo imposible si no se hace en equipo.

Debo agradecer al grupo del CeGen del nodo de Santiago, donde di mis primeros pasos. El *highthroughput* comienza haciendo combinaciones de colores de pequeñas pegatinas, poniéndolas en tapas, también pequeñas, de cientos de *primers* liofilizados... y termina dejándose las retinas en puntitos y espectros. Así, agradezco a Rosana su dedicación. A Inés... ¡ien fin!! la llevo siempre. A María Torres por estar ahí codo a codo con los puntitos a cuestras, por su ayuda y por supuesto por su guacamole... A Bea Sobrino... ¡Dónde quedan aquellos primeros intentos en SNPlex!

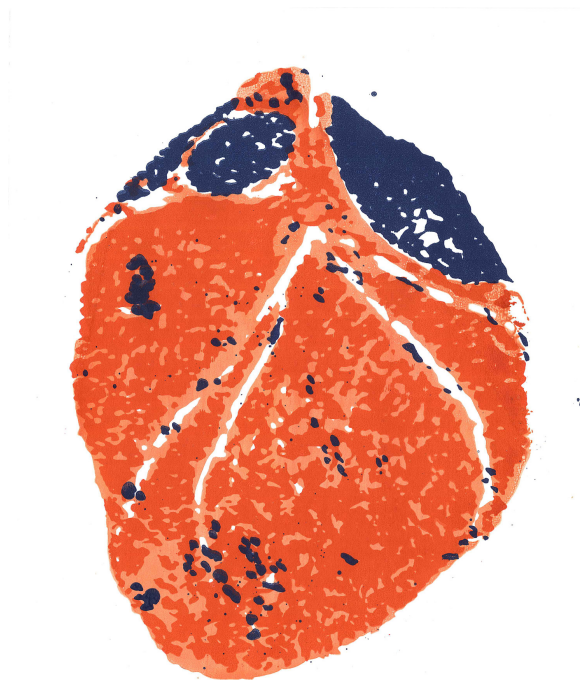
A todo el personal del “depar” y del hospital donde se ha formado y se forma constantemente un grupo, enorme en número y potencial investigador y donde he tenido la suerte de encontrar buenos amigos. A Noa con quien comparto la ilusión de futuros trabajos; aunque a

veces nos hacemos *batiburrillo*, preveo grandes proyectos, uno o dos estrictamente profesionales. Los personales, se sobreentienden.

A mis amigos les agradezco que me hayan animado y hayan sabido entender el “abandono” de estos últimos meses. A Liuchina, a quien debo muchas tardes de playa... A Elisa, ahora me toca animarla y mimarla a mí.

Agradecer a Javi, a mi padre y a mi hermano. A Javi le agradezco infinitamente el haber estado y estar siempre. Me ha aguantado, por no decir que me ha “sufrido” estos últimos meses y siempre con buenas palabras, gestos y apoyo incondicional. A mis *Gonzas*, mi padre y mi hermano, a los que este mundo les queda lejos y sin embargo a base de escucharme casi podían haber escrito ellos esta tesis, gracias por la paciencia y por ser la mayor de mis motivaciones.

A mi madre



2/6 57

2000

ABREVIATURAS

A: Adenina

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AHA: American Heart Association.

C: Citosina.

Da: Dalton.

DAD: Delayed Afterdepolarization.

DAI: Desfibrilador Automático Implantable.

dNTP: desoxinucleótido trifosfato

ddNTP: didesoxinucleótido trifosfato.

EADs: Early Afterdepolarization.

ECG: Electrocardiograma.

ECO: Ecocardiograma.

EDTA: Etilendiaminotetraacético.

ESC: European Society of Cardiology.

FV: Fibrilación Ventricular.

G: Guanina.

HFSA: Heart Failure Society of America.

HGMD: *the Human Gene Mutation Database at Institute of Medical Genetics in Cardiff*.

Ig: Inmunoglobulina.

IML: Instituto de Medicina Legal.

INE: Instituto Nacional de Estadística.

INT: Instituto Nacional de Toxicología.

INTCF: Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses.

ISFC: International Society and Federation of Cardiology.

Kb: Kilo bases.

MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time-Of-Flight.

MAVD: Miocardiopatía Arritmogénica del Ventrículo Derecho.

MCD: Miocardiopatía Dilatada.

MCH: Miocardiopatía Hipertrófica.

MCR: Miocardiopatía Restrictiva.

MgCl₂: Cloruro de Magnesio.

MS: Muerte Súbita.

MSC: Muerte Súbita Cardíaca.

μl: microlitro.

mm: milímetro.
ms: milisegundo.
mV: milivoltios.
ng: nanogramos.
NCHS: National Center for Health Statistics.
NGS: Next Generation Sequencing.
OMS: Organización Mundial de la Salud.
Pb: Pares de bases
PCR: Polymerase Chain Reaction.
SAP: Shrimp Alkaline Phosphatase.
SBE: Single Base Extension.
SBr: Síndrome de Brugada.
SMSL: Síndrome de la Muerte Súbita del Lactante.
SNP: Single Nucleotide Polymorphism.
SQTC: Síndrome de QT Corto.
SQTL: Síndrome de QT Largo.
SUD: Sudden Unexplained Death.
T: Timina.
T^a: Temperatura.
Tpo: Tiempo.
Taq: *Thermus Aquaticus*.
TdP: *Torsades de Pointes*.
TV: Taquicardia Ventricular.
TVPC: Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. MUERTE SÚBITA	3
1.1. DEFINICIÓN:.....	3
1.2. EPIDEMIOLOGÍA	4
1.2.1. Muerte súbita en menores de un año.....	4
1.2.2. Muerte súbita en niños y jóvenes.	5
1.2.3. Muerte súbita en el adulto.	5
2. MUERTE SÚBITA CARDÍACA.....	6
2.1. DEFINICIÓN.	6
2.2. INCIDENCIA.	6
2.3. FISIOPATOGENIA.....	7
2.4. FACTORES DE RIESGO.	8
2.5. TRASTORNOS CARDÍACOS ASOCIADOS.	9
2.5.1. TRASTORNOS ESTRUCTURALES.....	10
2.5.1.1. Miocardiopatía Hipertrófica Familiar.....	12
2.5.1.2. Miocardiopatía Dilatada.	15
2.5.1.3. Miocardiopatía Restrictiva.....	16
2.5.1.4. Miocardiopatía Arritmogénica del Ventrículo Derecho.....	18
2.5.1.5. No Compactación del Ventrículo Izquierdo.....	19
2.5.2. TRASTORNOS ARRITMOGÉNICOS.....	19
2.5.2.1. Síndrome de QT Largo.	23
2.5.2.2. Síndrome de QT corto.....	26
2.5.2.3. Síndrome de Brugada.	28
2.5.2.4. Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica.....	30
2.5.3. SÍNDROME DE LA MUERTE SÚBITA DEL LACTANTE.....	31
3. GENÉTICA DE LA MUERTE SÚBITA CARDÍACA.	32
3.1. MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA FAMILIAR.....	32
3.1.1. EPIDEMIOLOGÍA GENÉTICA.	33
3.1.2. CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO.	41
3.1.3. ESTUDIO GENÉTICO.	46
3.1.4. CONSEJO GENÉTICO.....	47
3.2. SÍNDROME DE QT LARGO.	48
3.2.1. EPIDEMIOLOGÍA GENÉTICA.....	48
3.2.2. CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO.....	51
3.2.3. ESTUDIO GENÉTICO.....	52
3.2.4. CONSEJO GENÉTICO.	53
3.3. SÍNDROME DE LA MUERTE SÚBITA DEL LACTANTE.....	53
3.3.1. EPIDEMIOLOGÍA GENÉTICA.....	53

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	57
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
1. MUESTRAS.....	63
1.1. ASPECTOS ÉTICOS	63
1.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	63
2. EXTRACCIÓN DEL ADN.....	65
3. CUANTIFICACIÓN DEL ADN.....	65
4. ESTUDIO DE VARIANTES GENÉTICAS.....	66
4.1. SELECCIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS.....	66
4.1.1. VARIANTES GENÉTICAS EN MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA FAMILIAR.	66
4.1.2. VARIANTES GENÉTICAS EN EL SÍNDROME DE QT LARGO.	67
4.2. DISEÑO DE REACCIONES MULTIPLEX.....	67
4.3. DETECCIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS: SEQUENOM MASS ARRAY™ SYSTEM.....	68
5. SECUENCIACIÓN DIRECTA.	71
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	79
IV. RESULTADOS.....	81
1. Bloque 1:.....	85
1.1. Artículo 1: Molecular genetics of sudden cardiac death.	87
1.2. Artículo 2: New technologies in the genetic approach to sudden cardiac death in the young	103
2. Bloque 2:.....	117
2.1. Diseño de estrategia de análisis de variantes genéticas implicadas en MCH.....	119
2.2. Artículo 3: A new approach to long QT syndrome mutation detection by Sequenom MassARRAY® system.	125
3. Bloque 3:.....	147
3.1. Artículo 4: Identification of a Novel MYBPC3 Gene Variant in a patient with hypertrophic Cardiomyopathy.	149
3.2. Artículo 5: Genetic screening in Sudden Cardiac Death related cases.....	157
3.3. Artículo 6: Sarcomeric gene mutations in sudden infant death syndrome (SIDS).	179
V. DISCUSIÓN.....	197
VI. CONCLUSIONES.....	203
VII. ANEXOS.....	207
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	245

I. INTRODUCCIÓN

1. MUERTE SÚBITA

1.1. DEFINICIÓN:

Se considera muerte súbita (MS) aquella muerte natural que tiene lugar de manera rápida e inesperada en individuos aparentemente sanos y en la cual la pérdida de las funciones vitales ocurre instantáneamente o en un breve intervalo de tiempo desde el inicio de los síntomas. La definición más aceptada considera la muerte súbita como una muerte inesperada que ocurre una hora después de haber empezado los síntomas o bien 24 horas después de haber sido vista la víctima por última vez en buen estado de salud si se trata de una muerte que no ha sido presenciada. Las muertes no presenciadas, por ejemplo las que tienen lugar durante el sueño, suponen aproximadamente el 40% de los casos [1]. En muchas ocasiones estas muertes sobrevienen sin asistencia médica e incluso sin testigos por lo que son consideradas muertes sospechosas, de modo que se debe practicar una autopsia médico-legal. Una vez finalizada ésta y descartado el origen violento en cualquiera de sus modalidades (accidental, suicidio, homicidio...) se confirma que la causa del fallecimiento es de origen natural, consecuencia, en muchos casos, de una trágica complicación de diversas patologías clínicas, que pueden ser de origen cerebral (ej: hemorragia subaracnoidea o cerebral), respiratorio (ej: asma, anafilaxis), por hemorragia aguda (ej: aneurisma por rotura aórtica, úlcera péptica), choque séptico o causas cardíacas [2].

Actualmente no existe consenso con respecto a la definición temporal de la muerte súbita ni sobre la inclusión o no de personas con enfermedades previas. Son varios los intervalos de muerte súbita propuestos, que varían desde los 15 minutos a las 24 horas [3] [4], siendo el de una hora y el de seis horas los más utilizados, principalmente en los trabajos de muerte súbita cardíaca. En relación a la patología previa se pueden distinguir tres grupos: el primero incluye personas totalmente asintomáticas, en los que la muerte súbita es la primera manifestación de la enfermedad; el segundo engloba personas con síntomas de riesgo (p.ej. síncope) pero sin un diagnóstico de una entidad patológica conocida; el último grupo abarca personas con una enfermedad crónica estable (p. ej. asma, epilepsia, malformaciones cardíacas congénitas, cardiopatías etc.). Generalmente, se suelen incluir los sujetos con patología conocida, potencialmente letal, que estaban estables hasta el momento del evento terminal, y que fallecen de forma rápida por una nueva manifestación de la enfermedad o por una complicación no esperada [5] [6].

Se estima que en un 50 % de las autopsias las muertes son consideradas por causa natural. De éstas, entre el 5 y el 10% la causa de muerte no puede ser esclarecida tras la autopsia habitual y entre un 1 y un 5% son negativas tras autopsia macro y microscópica y análisis de laboratorio [7].

1.2. EPIDEMIOLOGÍA.

La muerte súbita puede ser clasificada en tres grupos en relación con la edad: muerte súbita en niños menores de un año; en niños mayores de un año y adultos jóvenes y muerte súbita en adultos.

1.2.1. Muerte súbita en menores de un año.

En este grupo la principal causa de muerte es el Síndrome de Muerte Súbita del lactante (SMSL), el cual ha sido definido por Krous y colaboradores (San Diego) como aquella muerte que afecta a niños menores de un año de edad que fallecen súbita e inesperadamente, en los que el inicio del episodio fatal está asociado con el sueño y en los cuales, tras una minuciosa investigación del caso, incluyendo la historia clínica, examen del lugar de la muerte y autopsia completa con exámenes complementarios, no se encuentra una explicación a dicha muerte [8].

Diversos factores ambientales tales como la posición del recién nacido durante el sueño o el tabaquismo materno durante la gestación se han estudiado como causas potenciales de esta patología. Según la experiencia del departamento del Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses (INTCF) de Madrid tras un estudio de 244 casos el 36% de las muertes súbitas de niños menores de un año podrían considerarse SMSL (categoría I de la definición de San Diego); en un 15% existen lesiones de escasa intensidad como para explicar la muerte (categoría II); en un 38% se trata de muertes explicadas por causa natural o violenta; el 11% restante correspondería a muertes no clasificadas debido a que las autopsias son incompletas [9] [10].

En Estados Unidos la media anual de muertes debidas a SMSL entre los años 1983 y 1992 obtuvo valores de entre 5000 y 6000 aunque en los últimos años el número de muertes ha ido disminuyendo significativamente debido a las campañas de prevención tales como recomendaciones de cambio de posición del neonato durante el sueño y la modificación de otros factores de riesgo conocido. El *National Center for Health Statistics* (NCHS, 2004) informó que en el año 2002 murieron en Estados Unidos 2295 lactantes menores de un año de edad a causa del SMSL. A pesar del descenso de casos, el SMSL continúa siendo la primera causa de muerte de niños de entre un mes y un año de edad en países desarrollados. Japón y Holanda tienen las tasas más bajas, con 0.09 y 0.1 casos/1000 nacidos vivos, respectivamente; Estados Unidos y el Reino Unido tienen tasas intermedias con 0.57 y 0.41 casos/1000 nacidos vivos. En España aunque, no disponemos de datos fiables y las estadísticas son muy dispares, se estima una incidencia de entre 0.2 y 0.3/1000 nacidos vivos. De esta forma, si en España nacen anualmente unos 500.000 niños (519.779 niños en 2008, según INE) esperaríamos tener entre 104-156 casos durante este período de tiempo.

La edad temprana de estos individuos y el estadio de desarrollo dificulta el abordaje de esta patología. Se trata de individuos de los que, normalmente, no se dispone de historia clínica, no se ha descrito patología previa de interés o no hay hallazgos de trastorno arritmogénico en electrocardiograma (ECG). Los hallazgos en la autopsia son inexistentes. La autopsia se dificulta en estos casos debido a que los bebés no retienen orina, por lo que el material de partida para el análisis toxicológico se reduce. La sangre y el tejido son, por tanto, el punto de partida para cualquier estudio post mórtem en estos casos y debido al pequeño tamaño de los órganos y el poco volumen de sangre, la muestra resulta escasa.

1.2.2. Muerte súbita en niños y jóvenes.

La muerte súbita en personas entre uno y 35 años de edad se debe a una gran variedad de causas sin que exista un claro predominio de ninguna etiología, a diferencia de lo que ocurre en el adulto, en el que sobresale la muerte súbita debida a enfermedad ateromatosa coronaria. Las causas más frecuentes de muerte súbita en edad pediátrica y en adulto joven son las de origen cardiovascular, principalmente en relación a miocardiopatías, anomalías congénitas de las arterias coronarias, miocarditis, enfermedades cardíacas congénitas y anomalías del sistema de conducción [11] [12] [13] [14].

La incidencia de la muerte súbita en población general de 20 a 75 años es 1/1000 individuos/año, pero cuando nos atenemos a individuos de entre uno y 40 años de vida pasamos a una incidencia de entre 1.3 y 8.5/100000/año [15] y la gran mayoría son debidas a causas cardíacas. Su incidencia también varía en función del sexo; tanto en estudios de muerte súbita general como de muerte súbita cardíaca [16] [17] se ha observado un riesgo superior de muerte súbita en los varones que en las mujeres.

La mayor parte de estas muertes son de causa no isquémica, lo que pone de manifiesto una alta proporción de enfermedades hereditarias responsables de estas muertes, que pueden presentarse con hallazgos mínimos en la autopsia o, incluso, en individuos con un corazón estructuralmente normal. Se estima que la causa de la muerte no puede ser establecida tras autopsia completa y análisis de laboratorio en un intervalo de entre un 3 y un 30% de las muertes súbitas en esta población (niños y adultos jóvenes) [18] [19] [20] [21]. A este grupo de muertes súbitas, consideradas cardíacas por ser el fallo cardíaco el factor determinante de la muerte, se le denomina muerte súbita inexplicada, *sudden unexplained death* (SUD).

1.2.3. Muerte súbita en el adulto.

La cardiopatía isquémica, que en el 99% de los casos tiene como base una aterosclerosis coronaria, es la primera causa de muerte súbita en el mundo desarrollado. Es más frecuente que ocurra entre los 45 y 75 años, ya que en la población de más edad la insuficiencia cardíaca es la causa más común de muerte. La incidencia en varones es más alta que en mujeres en todos los grupos de edad, y en algunos estudios incluso llega a triplicar sus valores.

2. MUERTE SÚBITA CARDÍACA.

2.1. DEFINICIÓN.

Tras excluir causas extracardíacas al concluir la autopsia médico-legal, la muerte súbita se considera Muerte Súbita Cardíaca (MSC), que puede ser derivada de mecanismos arrítmicos o de anomalías estructurales que comprometen la función mecánica del corazón. Además, en la práctica clínica, se considera súbita aquella muerte causada por un daño cerebral irreversible pese a haber sido recuperada de un paro cardíaco fulminante [2].

Distintas patologías cardíacas pueden dar lugar a la muerte súbita cardíaca. Éstas pueden afectar a las arterias coronarias, puede tratarse de valvulopatías, defectos en el sistema de conducción, rotura o defecto intrapericárdico de la aorta o de la arteria pulmonar o pueden afectar al miocardio y asociarse a disfunción cardíaca.

La muerte súbita cardíaca es una de las causas de muerte más comunes y supone un problema grave para los sistemas de salud en países desarrollados.

La causa y forma de la muerte puede ser establecida tras autopsia en un número elevado de casos ya que las anomalías cardíacas son evidentes en la autopsia. Sin embargo, el principal problema es establecer la causa de la muerte, especialmente en adultos jóvenes en los que pocos o ningún hallazgo es encontrado tras la autopsia y los análisis de laboratorio. Supone, por tanto, un grave problema de salud ya que se trata de individuos aparentemente sanos que fallecen de forma inesperada a edades muy tempranas.

En la práctica, la cantidad de información que reciben los anatomopatólogos a la hora de enfrentarse a un caso de muerte súbita es muy variada. Las circunstancias de la muerte no están siempre bien establecidas y la historia clínica y familiar no está disponible en muchas ocasiones. Estos factores dificultan el diagnóstico por parte de los patólogos.

2.2. INCIDENCIA.

La MSC es una de las principales causas de muerte en los países occidentales, representa entre el 80% y el 90% de las MS del adulto. Aunque su incidencia varía según los distintos estudios y edades, se estima que se sitúa alrededor de 30-200/ 100.000 habitantes/año [22], de modo que nos encontramos ante un problema mayor de salud, que supone la muerte de aproximadamente 335.000 adultos cada año en Estados Unidos y 100.000 en el Reino Unido.

Dado que la mayoría de los estudios sólo consideran las muertes intrahospitalarias estas cifras constituyen una apreciación a la baja. En España se deben producir unas 9.000 muertes súbitas cardíacas al año en pacientes de entre 25 y 74 años aunque en pocas ocasiones son diagnosticadas como muerte súbita cardíaca en el Boletín Estadístico de Defunción, el medio utilizado para la elaboración de estadísticas. En menores de 31 años la incidencia de MSC se ha estimado en 1,2/100000 habitantes en una serie del País Vasco [23].

La dificultad del cálculo de la incidencia radica en la propia definición de la muerte súbita cardíaca. Cabe destacar que en muchos casos los informes médicos no son accesibles, no se realiza autopsia y/o la causa de muerte que se da en el certificado de defunción es poco específica [24].

2.3. FISIOPATOGENIA.

Es importante distinguir la muerte súbita cardíaca del infarto agudo de miocardio. La muerte súbita cardíaca tiene lugar por trastornos del ritmo cardíaco tales como la taquicardia ventricular, la fibrilación ventricular o una bradiarritmia severa. La muerte súbita suele ser precedida de síntomas como el dolor de pecho, palpitaciones, disnea, o síncope, aunque en un 40-50% de los casos la muerte súbita cardíaca tiene lugar sin síntomas previos [25] [26]. El infarto agudo de miocardio se debe a la oclusión de una arteria coronaria que provoca un desequilibrio entre la demanda y el suministro de sangre al miocardio. En ocasiones, los pacientes sufren un infarto agudo de miocardio previo a la muerte súbita cardíaca [27].

El mecanismo último de la muerte súbita cardíaca suele ser una arritmia cardíaca, generalmente una fibrilación ventricular o una taquicardia ventricular que evoluciona hacia fibrilación ventricular [28]. Esta arritmia maligna no responde a un origen único sino que es de base multifactorial. El mecanismo fisiopatológico de la muerte súbita cardíaca se produce por la interacción de anomalías estructurales, que proporcionan el sustrato morfológico, con alteraciones funcionales, las cuales actuarían como desencadenantes, dando lugar a la desestabilización eléctrica responsable de la arritmia fatal.

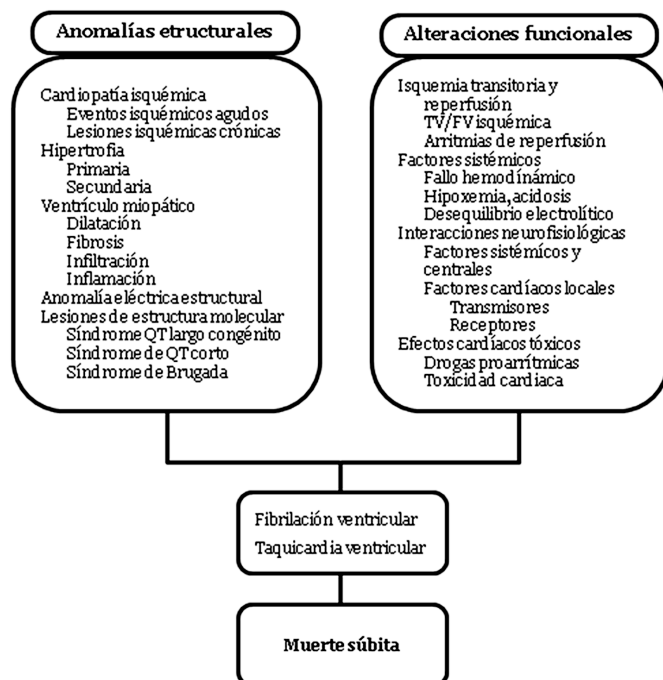


FIGURA 1: Principales mecanismos fisiopatológicos de la MSC.

2.4. FACTORES DE RIESGO.

El riesgo de sufrir muerte súbita presenta dos picos de edad en los cuales la frecuencia es más elevada: el primero es desde el nacimiento hasta los seis primeros meses de vida y el segundo entre los 45 y 75 años [29]. En este último caso, más del 80% de los casos se asocian a enfermedad coronaria. La miocardiopatía hipertrófica o dilatada suponen el 10-15% de los casos y el 5-10% se deben a desórdenes genéticos primarios como el síndrome de QT largo, el síndrome de Brugada o la muerte súbita sin patología cardíaca estructural y sin etiología genética identificada [25] [26] [30].

En la práctica clínica la evaluación del riesgo de sufrir una muerte súbita viene determinada principalmente por la disfunción severa del ventrículo izquierdo medida por la fracción de eyección del mismo. Otros parámetros han sido evaluados como predictores de riesgo, algunos relacionados con la variabilidad del ritmo cardíaco, otros con variaciones en el electrocardiograma o con la alternancia de las ondas T, pero ninguno de ellos son suficiente para estimar el riesgo real del paciente de sufrir una muerte súbita cardíaca [27]. A pesar de ser la variable más utilizada, la disfunción severa del ventrículo izquierdo representa sólo una minoría de los casos de muerte súbita cardíaca: estudios poblacionales demuestran que menos de 1/3 del total de casos de muertes súbitas cardíacas presentan una fracción de eyección del ventrículo izquierdo severamente reducida [1] [31] [32]

Diferentes factores de riesgo han sido descritos. Éstos incluyen parámetros clínicos como la hipertensión, la diabetes mellitus, la hipercolesterolemia o la obesidad así como factores genéticos como la historia familiar de MSC. El sexo varón, la edad o hábitos como el tabaquismo también son utilizados como posible factor de riesgo de MSC. A estos factores se pueden sumar los hallazgos en autopsia (dilatación o hipertrofia ventricular), el fallo cardíaco (arritmogénesis o la fracción de eyección del ventrículo izquierdo). Los hallazgos electrocardiográficos son importantes en la evaluación de este riesgo, especialmente para el diagnóstico de desórdenes arritmogénicos primarios como el síndrome de QT largo, Síndrome de QT corto, Síndrome de Brugada, miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho o el síndrome de Wolff Parkinson White, todos ellos relacionados con MSC [24].

Numerosos estudios tratan de establecer marcadores de riesgo de MSC tales como fenotipos de alto riesgo (mediante estudios de susceptibilidad genética por ejemplo en síndromes familiares), estudio de variantes genéticas o de biomarcadores [27]. El avance en la investigación de dichos marcadores permitirá en un futuro una evaluación lo más veraz posible del riesgo potencial en cada caso clínico individual.

Se ha propuesto un panel para la evaluación de factores de riesgo de MSC en pacientes diagnosticados de MCH. Éstos se muestran en la tabla 1 adjunta.

PRINCIPALES	POSIBLES
PARO CARDÍACO PREVIO RECUPERADO (FIBRILACIÓN VENTRICULAR) O TAQUICARDIA VENTRICULAR ESPONTÁNEA SOSTENIDA.	FIBRILACIÓN ATRIAL
TAQUICARDIA VENTRICULAR NO SOSTENIDA (HOLTER)	ISQUEMIA MIOCÁRDICA
SÍNCOPE INEXPLICADO	OBSTRUCCIÓN DEL FLUJO DEL TRACTO DE SALIDA DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO
GROSOR DE LA PARED DEL VENTRICULO IZQUIERDO ≥ 30mm	MUTACIONES DE ALTO RIESGO
PRESIÓN CARDÍACA ANORMAL DURANTE EL EJERCICIO	ESFUERZO FÍSICO INTENSO (DE COMPETICIÓN)
HISTORIA FAMILIAR DE MSC PREMATURA	

TABLA 1: Factores de riesgo de MSC en pacientes con MCH. | Fuente : Christiaans, I. et al (2010) [33].

Se han propuesto factores de riesgo potenciales de MSC que pueden ser detectados en el electrocardiograma. Éstos se recogen en la tabla 2.

ELECTROCARDIOGRAMA DE 12 DERIVACIONES
ONDAS Q PATOLÓGICAS O CAMBIOS DINAMICOS DE LOS SEGMENTOS ST
PROLONGACIÓN DE LA DURACION DE QRS
AUMENTO DEL VOLTAJE DE LA ONDA R
QRS FRAGMENTADO
INTERVALO QT PROLONGADO
ELECTROCARDIOGRAFÍA EN EJERCICIO (PRUEBA DE ESFUERZO)
RECUPERACIÓN REDUCIDA DE RITMO CARDÍACO
CAPACIDAD FUNCIONAL REDUCIDA
ECTOPÍA VENTRICULAR AUMENTADA
ONDAS T ALTERNAS
SEÑAL PROMEDIO ELECTROCARDIOGRÁFICA
POTENCIALES TARDÍOS
ELECTROCARDIOGRAFÍA HOLTER AMBULATORIA
VARIABILIDAD EN LA REDUCCIÓN DEL RITMO CARDÍACO
TAQUICARDIA VENTRICULAR NO SOSTENIDA

TABLA 2: Marcadores de riesgo de MSC en parámetros electrocardiográficos. | Fuente : Adabag, A.S., et al. (2010) [24].

2.5. TRASTORNOS CARDÍACOS ASOCIADOS.

Se estima que aproximadamente el 80% de las muertes súbitas cardíacas en población adulta es debida a enfermedad coronaria aguda. En la autopsia, entre el 10 y el 80% de estos casos presentan placas de ateroma intracoronarias rotas o erosionadas, trombos o ambos. Estos hallazgos son indicativos de un síndrome coronario agudo [34] [35] Aproximadamente el 30%

de los casos presenta cicatrices que revelan infartos anteriores en el miocardio. Estas cicatrices pueden actuar como sustratos para taquicardias ventriculares potencialmente letales. Diversas patologías pueden actuar como desencadenantes de arritmias ventriculares: hipertrofia del ventrículo izquierdo, fibrosis intersticial, amiloidosis, miocarditis u otras anomalías estructurales que pueden no haberse detectado en vida y ser detectadas en la autopsia [36] [37].

Las enfermedades cardíacas congénitas, miocardiopatías y la hipertrofia inexplicada del ventrículo izquierdo explican la mayor parte de los casos de muerte súbita cardíaca en población joven, especialmente en atletas.

Como hemos explicado, la muerte súbita cardíaca de causa no isquémica tiene especial relevancia ya que incluye con frecuencia patologías hereditarias que podrían suponer un riesgo para los familiares. Éstas pueden presentarse con defectos en la morfología que son detectables en la autopsia, aunque estos hallazgos pueden ser mínimos o incluso nulos tras una autopsia completa. A estos trastornos les llamaremos trastornos estructurales. En ocasiones, ninguna anomalía es encontrada en la autopsia. Estas muertes han tenido lugar por un fallo arritmogénico letal. A este grupo de muertes causadas por un defecto del ritmo cardíaco les llamaremos trastornos arritmogénicos. La clasificación en dos grupos no está exenta de solapamientos entre patologías que, como veremos, son de gran heterogeneidad. Esta división supone una simplificación de la clasificación de las patologías cardíacas hereditarias que se asocian con la muerte súbita cardíaca. Tal vez la genética molecular nos permitirá en un futuro una clasificación más exacta de este grupo de patologías de gran diversidad en su fenotipo y expresión.

2.5.1. TRASTORNOS ESTRUCTURALES.

Las patologías estructurales que pueden dar lugar a muerte súbita cardíaca se denominan, genéricamente, miocardiopatías. Se trata de enfermedades del miocardio que cursan con disfunción cardíaca, que puede complicarse dando lugar a fallo cardíaco, arritmias y muerte súbita.

La clasificación de las miocardiopatías ha estado en constante actualización debido a los avances tanto en el diagnóstico clínico y forense como en el conocimiento de las bases genéticas de estas patologías.

La primera clasificación data de 1980- 1996. Ésta agrupaba las diferentes patologías por el efecto morfológico que causaban en el corazón. Así, describía enfermedades del músculo cardíaco con dilatación (miocardiopatía dilatada), con hipertrofia (miocardiopatía hipertrófica), miocardiopatía no compactada (no compactación del ventrículo izquierdo), miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho y miocardiopatías no clasificables. En 1996 la OMS (Organización Mundial de la Salud) y la ISFC (*International Society and Federation of Cardiology*) añaden la miocardiopatía inflamatoria como una nueva entidad diferenciada, que presentaba, a nivel histológico, miocarditis y se asociaba a disfunción cardíaca. Reconocía formas infecciosas y autoinmunes dentro de estas cardiopatías inflamatorias. Si la infección viral cursaba con dilatación se denominaba cardiopatía viral y si además se acompañaba de inflamación recibía el nombre de miocardiopatía inflamatoria viral o miocarditis viral con cardiomegalia [38].

En 2006 la Asociación Americana del Corazón, conocida como AHA por sus iniciales en inglés *American Heart Association* propone una nueva clasificación teniendo en cuenta el desarrollo de estudios genéticos y de niveles de expresión celular que permiten conocer las variantes genéticas de patologías categorizadas, anteriormente, como no clasificables. Clasifica las miocar-

diopatías en primarias y secundarias. Por miocardiopatía primaria entienden aquella miocardiopatía en la que el corazón es el único órgano (o el principal) implicado en la patología. Diferencian tres grupos dentro de las miocardiopatías primarias: miocardiopatías primarias genéticas, mixtas y adquiridas. En las miocardiopatías secundarias la disfunción cardíaca es parte de un desorden sistémico. Diferencian entre patologías del citoesqueleto (miocardiopatía dilatada, y la cardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho), sarcoméricas (miocardiopatía hipertrófica y la no compactación del ventrículo izquierdo) e incluyen las canalopatías iónicas (a las que nosotros llamamos trastornos arritmogénicos) dentro de las cardiopatías primarias [39].

En 2008 la Sociedad Europea de Cardiología, ESC por sus iniciales en inglés *European Society of Cardiology*, definen las miocardiopatías como desórdenes del miocardio en los que el músculo cardíaco es estructural y funcionalmente anormal y en los que la enfermedad coronaria, hipertensión, enfermedades congénitas y valvulares o bien están ausentes o bien no son suficientes para explicar la anomalía miocárdica. Consideran que la distinción entre miocardiopatías primarias y secundarias no es suficiente ya que algunas de las patologías clasificadas como primarias pueden estar asociadas a una manifestación extra cardíaca. Además, en algunas de las clasificadas como secundarias el corazón puede ser el único o prácticamente el único órgano implicado. Afirman que la clasificación de las miocardiopatías por los defectos genéticos que las causan supone un problema para la práctica clínica de rutina ya que el diagnóstico no suele comenzar por la identificación de estas variantes genéticas. De este modo, proponen una clasificación orientada a la práctica clínica. Los desórdenes del músculo cardíaco fueron agrupados según su morfología y su función facilitando de este modo el diagnóstico y el manejo de pacientes y familiares de forma inmediata (figura 2). Esta clasificación unida además a la biopsia miocárdica en la práctica clínica, permite la identificación del componente genético, autoinmune y factores virales y por tanto la diferenciación de las formas familiares y no familiares de la enfermedad estructural del miocardio [40].

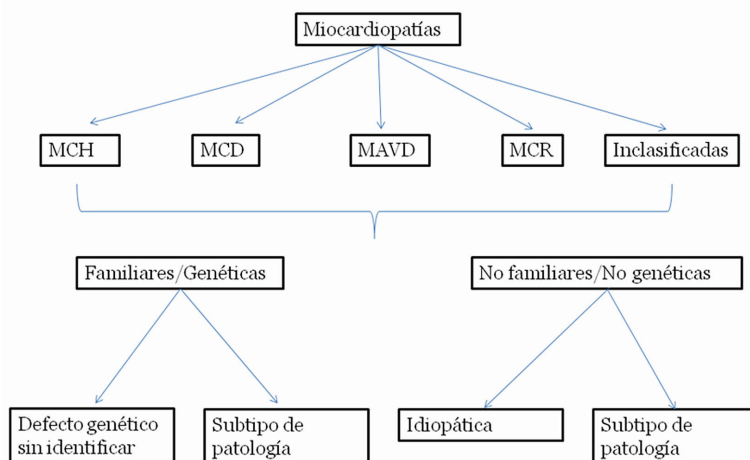


FIGURA 2: Clasificación de las miocardiopatías propuesta por la ESC. | Traducción de Elliott, P., B., et al.(2008)[40].

La clasificación de las miocardiopatías supone un reto por diversos motivos como, por ejemplo, el hecho de que una misma mutación puede dar lugar a diferentes fenotipos tanto dentro de una misma familia como entre familias no relacionadas o que la misma miocardiopatía puede ser originada por muchas mutaciones diferentes. En ocasiones los fenotipos combinan dos entidades diferentes, como la mezcla de dilatación e hipertrofia, que dificulta aún más establecer la clasificación de estas patologías.

2.5.1.1 Miocardiopatía Hipertrófica Familiar.

El estrés o tensión de la pared ventricular junto a la activación neurohormonal (entre los que destacan el sistema adrenérgico, el sistema renina-angiotensina-aldosterona y la hormona antidiurética) estimulan el desarrollo de una hipertrofia a nivel del ventrículo debido a que aumenta el tamaño de los miocitos (y no al aumento del número de los mismos, que daría lugar a otras patologías como la hiperplasia) y al depósito de matriz extracelular. Estos mecanismos ayudan a mantener la fuerza en la contracción ventricular así como a reducir el estrés de la pared. Sin embargo este aumento en la rigidez del ventrículo deriva en el aumento de la presión diastólica. La hipertrofia del miocardio es considerada por algunos autores como una respuesta adaptativa en presencia de sobrecarga de presión ya que la hipertrofia permitiría contrarrestar el estrés parietal mientras otros sostienen que se trata de una mala adaptación del miocardio en presencia de determinados factores enzimáticos. Estudios en modelos animales, a los que se bloquea la respuesta hipertrófica ante sobrecarga de presión, demuestran que el desarrollo de hipertrofia es perjudicial y debe considerarse una respuesta mal-adaptativa.

En situación de sobrecarga, el alargamiento del miocito da lugar a una variación en la morfología de la sarcómera, unidad anatómica y funcional (contráctil) del músculo representada en la figura 3. Esta variación puede derivar en los diferentes patrones de hipertrofia cardíaca (septal asimétrica, concéntrica, apical...).

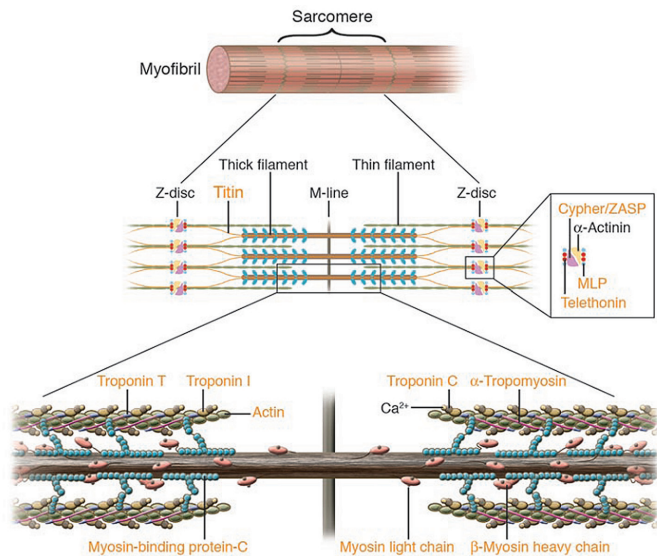


FIGURA 3: Esquema de la sarcómera y proteínas asociadas. | Fuente: Morita, H., et al. (2005) [41].

La miocardiopatía hipertrófica familiar (MCH) es la enfermedad genética cardiovascular más frecuente y representa la causa de muerte más común en jóvenes previamente asintomáticos [42]. La prevalencia de esta patología en población general es de 0,2% [43]. Se estima que la MCH se presenta en forma esporádica en la mitad de los casos y como forma familiar en la otra mitad [44].

En atletas, la MCH ha demostrado ser una causa importante de muerte súbita. Es una patología compleja, con gran heterogeneidad en el genotipo, fenotipo, en su pronóstico y su abordaje terapéutico [45] [46]. La variabilidad inter e intrafamiliar de la MCH incluye desde formas benignas a malignas con un elevado riesgo de fallo cardíaco y de muerte súbita. La MCH cursa con una hipertrofia, con frecuencia asimétrica, del ventrículo izquierdo en que está implicado fundamentalmente el septo interventricular. La hipertrofia puede afectar a cualquier porción del ventrículo. Se han descrito numerosas variantes morfológicas. Puede derivar en una dilatación del ventrículo izquierdo que podría asemejarse a una miocardiopatía dilatada. La MCH provoca un aumento de la función sistólica y una disminución de la relajación diastólica. En la MCH la hipertrofia se produce en ausencia de otras patologías que, potencialmente, pueden dar lugar a hipertrofia miocárdica tales como la estenosis aórtica o fallos en la homeostasis de ciertos iones como el Ca^{2+} o el K^+ . El diagnóstico de la MCH se basa generalmente en ecocardiografía 2D.

En individuos en los que la hipertrofia coexiste con hipertensión o en atletas, el diagnóstico de la patología resulta complicado ya que estas circunstancias pueden dar lugar a una hipertrofia secundaria del ventrículo izquierdo. La hipertrofia del ventrículo izquierdo asociada a hipertensión sigue normalmente un patrón concéntrico y no suele superar los 15 mm. Si existe historia familiar de MCH y una hipertrofia ligera el estudio genético será definitivo para la exclusión o no de MCH familiar en individuos con hipertensión.

En el caso de los atletas, la hipertrofia del ventrículo izquierdo se considera normal (asociada al desarrollo del miocardio por el ejercicio intenso) si es ligera (≤ 16 mm) y no presenta disfunción diastólica ni cambios morfológicos en la cavidad atrial. En el ECG no se encuentran ondas Q prominentes y la hipertrofia remite si cesa la práctica deportiva [47] [48]. La OMS define la MCH como una enfermedad del músculo cardíaco que cursa con hipertrofia del ventrículo izquierdo sin que se diagnostique otra patología que la explique [38]. Por su parte, algunos autores la han definido como una patología de origen genético caracterizada por una hipertrofia miocárdica consecuencia de mutaciones en genes que codifican proteínas sarcoméricas [49] [39]. Esta descripción no es de fácil aplicación en la rutina clínica y plantea problemas de la propia definición de la enfermedad ya que pueden darse situaciones en las que esta definición no sea acertada como no detectar mutación alguna en los genes sarcoméricos en pacientes diagnosticados de MCH, detectar una mutación en un gen no sarcomérico o emitir un diagnóstico de MCH a los portadores de mutaciones que son asintomáticos. Esta problemática es un ejemplo de la dificultad de la clasificación presentada anteriormente.

A nivel histológico, los hallazgos patológicos en la MCH son variables. Los más característicos son la hipertrofia de los miocitos, la desorganización celular y miofibrilar, la fibrosis intersticial y el engrosamiento de la media en las arterias intramurales. La desorganización de los miocitos cardíacos con frecuencia llega a comprometer más del 20% del ventrículo [44]. En la figura 4 se muestra la imagen post mórtem del corazón de un individuo con una marcada hipertrofia y la imagen post mórtem de un corazón normal. Se muestra además las diferencias a nivel histológico.

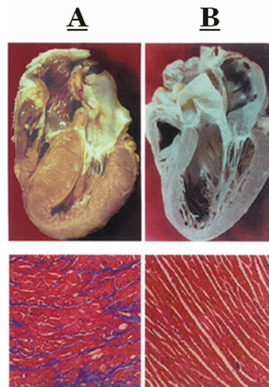


FIGURA 4: MCH. | A) Examen post mórtem de un individuo con una marcada MCH y corte histológico del corazón. Nótese el aspecto del corte histológico en que se aprecia ramificaciones de los miocitos, desorganización de las miofibrillas y fibras musculares y fibrosis intersticial que aparece de forma precoz en el curso de la enfermedad. B) Aspecto de un corazón normal y su corte histológico correspondiente. Adaptado de Chung, M., et al. (2003)[50].

La MCH se presenta como una enfermedad familiar, con un modo de herencia autosómico dominante y una penetrancia dependiente de la edad y sexo, causada por mutaciones en diferentes proteínas de los filamentos finos y gruesos del aparato contráctil del corazón, la sarcómera, aunque como veremos, se han descrito mutaciones en otros genes, genes que codifican línea Z, genes implicados en el transporte del calcio y proteínas mitocondriales. La gran heterogeneidad fenotípica y genotípica de la patología queda patente teniendo en cuenta que diferentes genes o diferentes mutaciones en el mismo gen pueden dar lugar a diferentes patrones morfológicos y a diferencias en la severidad de la enfermedad y su prognosis. Aunque más adelante profundizaremos en los aspectos genéticos de la MCH, cabe resaltar, a propósito de la variabilidad genotípica, que se han descrito casos de dobles y, más recientemente, triples mutaciones en un mismo individuo, las cuales dan lugar a una mayor severidad del fenotipo[51] [52]. El diagnóstico clínico es complicado de establecer por la similitud de la MCH con fenocopias en otras patologías. Existe un grupo de enfermedades metabólicas en las que el patrón hipertrófico es concéntrico tales como la enfermedad de Anderson- Fabry, citopatías mitocondriales, o el depósito de glucógeno. Éstas incluyen síntomas de enfermedad multisistémica [40].

Los síntomas más comunes en la MCH son la disnea debida a la disfunción diastólica, especialmente durante el ejercicio, así como el dolor de pecho por el aumento de la demanda de oxígeno. Las palpitaciones son también comunes y asociadas, normalmente, a mareo y, en ocasiones, a síncope que, aunque no es común, debe ser tenido en cuenta ya que puede ser indicador de riesgo de MSC [44]. En pacientes recuperados de un paro cardíaco previo se considera apropiada la implantación del DAI, sin embargo no está bien establecida la idoneidad del proto-

colo de implantación del dispositivo en pacientes con un único factor de riesgo como una hipertrofia severa.

En la figura 5 se muestra un caso clínico presentado por Maron en 2010 en el que se observa la idoneidad de la implantación del desfibrilador en un hombre de 35 años de edad diagnosticado de MCH y con historia familiar de MSC.

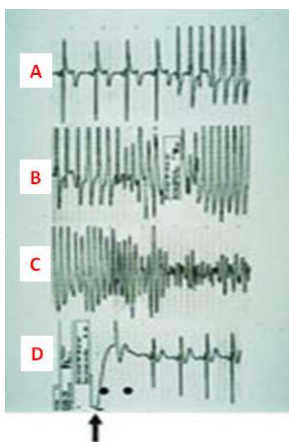


FIGURA 5: ECG obtenido durante el sueño en un paciente de 35 años de edad al que se implanta un DAI cinco años antes por ser diagnosticado de MCH y tener historia familiar de MSC. | A) TV que comienza de forma brusca (200 latidos/minuto). B) El DAI detecta la taquicardia y se carga. C) Evolución de la taquicardia a FV. D) El DAI emite una descarga de 20J (flecha) que restablece de forma inmediata el ritmo sinusal. La secuencia se repite de forma idéntica nueve años más tarde. Fuente: Maron, B. J. (2010) [53].

2.5.1.2 Miocardiopatía Dilatada.

La miocardiopatía dilatada idiopática (MCD) es la patología cardíaca congestiva más común en jóvenes con una incidencia aproximada de 40/100000 en población adulta aunque esta incidencia es menor en niños y varía con la edad [38] [54] [55]. Se caracteriza por el desarrollo de disfunción sistólica derivada de un aumento en la cavidad ventricular (del ventrículo izquierdo o en ambos ventrículos) en ausencia de enfermedad coronaria, anomalías valvulares o enfermedad del pericardio. La figura 6 muestra el aspecto post mórtem del corazón de un individuo con MCD. La MCD da lugar a un fallo cardíaco progresivo, arritmias ventriculares y supraventriculares, anomalías en el sistema de conducción, tromboembolismos o muerte súbita. Es la causa más frecuente de trasplante cardíaco.

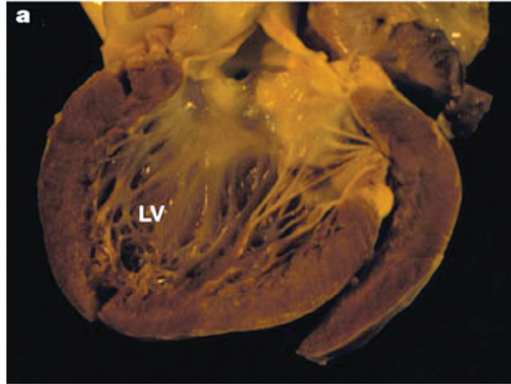


FIGURA 6: MCD. | Examen post mortem de un individuo con un corazón con una MCD severa. LV: Ventrículo izquierdo (Left Ventricle) Fuente: http://www.genedx.com/ext_upload_files/clinicians_guide_dcm.pdf.

El rango de edad más frecuente es la tercera o cuarta década de vida aunque también se ha descrito en niños. La patología suele ser identificada tras sufrir síntomas. Aproximadamente entre un 25-35% de los casos de DCM son familiares, aunque algunos autores dan un valor superior al 35% [56], llegando a considerar un rango de entre un 30-50% de los casos [57], con una penetrancia que depende de la edad. Encontramos diversas causas que dan lugar a la forma esporádica de la patología: agentes infecciosos (con frecuencia virus que dan lugar a miocarditis), agentes bacterianos, fúngicos, y parasitarios (Enfermedad de Chagas debida a infección por *Trypanosoma cruzi*) [39]. Otras formas adquiridas de la enfermedad incluyen deficiencias nutricionales, enfermedades del sistema endocrino, y la administración de drogas cardiotoxicas. Las formas autosómicas dominantes de la enfermedad representan la mayor parte de los casos de MCD, que pueden ser consecuencia de mutaciones en genes que codifican proteínas del citoesqueleto, de la sarcómera (en ocasiones la misma mutación cursa con MCD y/o MCH), de la línea Z, membrana nuclear y de los discos intercalares asociados a las células cardíacas. Ciertas formas de la MCD como las distrofias musculares que cursan con dilatación miocárdica (como la de Becker y Duchenne) están ligadas al cromosoma X [40]. La MCD puede encontrarse en pacientes con citopatías mitocondriales. Se han descrito mutaciones en el canal de Na^+ asociadas a defectos en la conducción y taquiarritmias supraventriculares [57].

2.5.1.3 Miocardiopatía Restrictiva.

La miocardiopatía restrictiva (MCR) ha sido siempre difícil de definir ya que la fisiología restrictiva tiene lugar en un amplio espectro de patologías diferentes. Se caracteriza por un incremento en la rigidez del miocardio que conlleva un ascenso de la presión ventricular y un pequeño aumento de volumen. Los hallazgos pueden ser similares a los de una pericarditis constrictiva severa y los síntomas incluyen disnea, disnea paroximal nocturna, ortopnea, edema periférico y ascitis así como fatiga general y debilidad. Se estima que más de un tercio de los pacientes con miocardiopatía restrictiva idiopática puede presentar complicaciones trombo embolicas. [58] La figura 7 muestra el aspecto de un ecocardiograma correspondiente a un paciente con MCR, el patrón electrocardiográfico característico y un corte histológico.

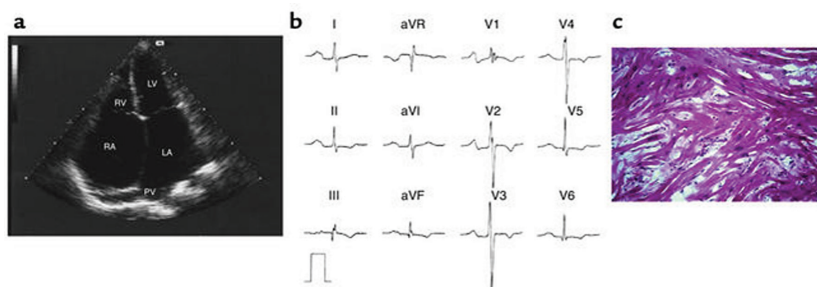


FIGURA 7: MCR. | A) Aspecto ecocardiográfico de una MCR B) ECG característico. C) corte histológico. Fuente: Mogensen, J., et al (2003) [59].

Kushwaha y colaboradores la definen como una enfermedad del músculo cardíaco que provoca que el llenado ventricular se vea dañado y la alteración del volumen diastólico; mientras, la función sistólica suele permanecer inalterada al menos en las etapas iniciales del desarrollo de la patología [60]. Sin embargo, Elliot y colaboradores consideran extraño que la contractibilidad sea normal con una fisiología restrictiva y definen la patología como una miocardiopatía con fisiología ventricular restrictiva con un volumen diastólico normal o reducido (de uno o ambos ventrículos), un volumen sistólico normal o reducido y un grosor normal de la pared ventricular. Aunque la fisiología restrictiva puede presentarse en las etapas finales de la MCH y MCD afirman que esta entidad no debe ser considerada una sub categoría independiente [40].

La prevalencia exacta es desconocida pero se trata probablemente de la miocardiopatía menos frecuente. Se han descrito formas idiopáticas, familiares y asociadas a diversas patologías sistémicas como la amiloidosis, sarcoidosis, tumores cardíacos, escleroderma y toxicidad a antraciclina. En el caso de la amiloidosis puede presentarse la angina como síntoma de la enfermedad. La fibrilación atrial es común en la amiloidosis cardíaca y en la MCR idiopática [61]. Tanto en amiloidosis como en sarcoidosis es común la presencia de anomalías en la conducción [62] [63] [64]. Patologías endocárdicas como la fibrosis, fibroelastosis y trombosis también pueden dar lugar a fisiología ventricular restrictiva, clasificadas como enfermedades endomiocárdicas con o sin hipereosinofilia (ej. Fibrosis endomiocárdica). Patologías exocárdicas como la pericarditis pueden dar lugar también a un patrón restrictivo.

Las formas familiares de la MCR con frecuencia presentan un modo de herencia autosómico dominante. Se han descrito mutaciones en el gen que codifica la troponina I y en el que codifica la desmina, éstas últimas asociadas a defectos en la conducción que normalmente se asocia a miopatía esquelética. Se ha descrito además un modo de herencia autosómico recesivo en las formas familiares como, por ejemplo, en la hemocromatosis causada por mutaciones en el gen HFE, o glucogenosis (o enfermedades de almacenamiento de glucógeno) y un patrón ligado al cromosoma X (ej. Enfermedad de Anderson – Fabry) [40].

Se trata de una patología de mal pronóstico. Se considera el trasplante de miocardio como opción en pacientes afectos de MCR familiar e idiopática. En el caso de la sarcoidosis, el órgano trasplantado puede volver a sufrir la patología [65]. El trasplante no suele ser considerado cuando se trata de una fisiología restrictiva debida a desórdenes sistémicos [60].

2.5.1.4 Miocardiopatía Arritmogénica del Ventrículo Derecho.

Se trata de una patología clínicamente heterogénea, de gran variabilidad inter e intrafamiliar y que comprende formas benignas y malignas con alto riesgo de muerte súbita. Se ha visto que afecta mayoritariamente a hombres en proporción 3:1 con respecto a las mujeres. Su prevalencia en población general varía entre 1:2000 y 1:5000; sin embargo se ha descrito como una causa frecuente de muerte súbita en jóvenes y en atletas [66].

La Miocardiopatía Arritmogénica del Ventrículo Derecho (MAVD) se define histológicamente por la sustitución del miocardio del ventrículo derecho por tejido adiposo o fibroadiposo que entapas tempranas del desarrollo de la enfermedad tiene lugar a nivel regional. En a figura 8 se observa esta sustitución del tejido cardíaco por tejido adiposo.



FIGURA 8: MAVD. | Aspecto de una sección transversal del corazón de un varón de 39 años que se muestra una infiltración adiposa severa. Fuente: McKenna W. J., et al. (1994)[67].

La enfermedad puede evolucionar llegando a comprometer la totalidad del ventrículo e incluso al ventrículo izquierdo. Este reemplazamiento de tejido miocárdico provoca retraso en la conducción lo que facilita la aparición de circuitos de reentrada y altera la dinámica ventricular. Se trata de una miocardiopatía progresiva con gran variabilidad en su expresión clínica y pronosis.

La MAVD en etapas avanzadas puede cursar con dilatación del ventrículo derecho, izquierdo o ambos por lo que puede resultar complicada la diferenciación entre la MAVD y la MCD a la hora de emitir un diagnóstico. [68]. Se manifiesta con palpitaciones, síncope o muerte súbita sin síntomas premonitorios. Pueden tener lugar episodios de taquicardia ventricular, normalmente relacionada con el ejercicio o esfuerzo físico.

La MAVD sigue un patrón de herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta. A nivel celular se produce un defecto en la adhesión debida a mutaciones en proteínas como la placoglobina, desmoplaquina, placofilina, desmogleína y desmocolina. Bauce y colaboradores describen dobles heterocigotos en mutaciones en genes diferentes, en el mismo gen e incluso triples mutaciones en un paciente con una MAVD muy severa. Afirman, además, una mayor afectación del ventrículo izquierdo en pacientes con múltiples mutaciones con respecto a los pacientes en los que se detecta encuentran una mutación exclusivamente [69].

2.5.1.5 No Compactación del Ventrículo Izquierdo.

La no compactación del ventrículo izquierdo se presenta con una morfología característica del ventrículo izquierdo de aspecto esponjoso, normalmente en la región apical del ventrículo (figura 9).

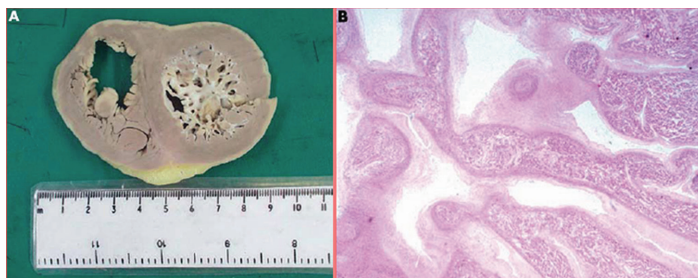


FIGURA 9: No compactación del ventrículo izquierdo. | A) corte transversal del corazón a nivel medio del septo en que se distingue la formación de recesos en la zona más interna del miocardio. Se distingue el aspecto esponjoso característico de la no compactación del VI. B) Imagen histológica en que se observan trabéculas con fibrosis. Fuente: Hughes, S.E. et al (2005) [70].

Las trabéculas que le dan este aspecto pueden ser consecuencia de un defecto en el desarrollo embrionario que se produce entre la quinta y la octava semana de gestación e impide la correcta compactación del miocardio. Provoca disfunción sistólica, fallo cardíaco (en algunos casos se realiza trasplante cardíaco), tromboembolismo, arritmias, diversas formas de remodelado y muerte súbita. Se han descrito formas familiares y esporádicas [39] aunque la forma familiar de la enfermedad es la más común [40] [71] [72] [73]. La identificación de familiares afectados es posible en torno al 50% de los casos [74]. La consideración de la no compactación como una miocardiopatía o como un patrón morfológico congénito o adquirido que comparten diferentes tipos de miocardiopatías es objeto de debate. Monserrat y colaboradores describen una mutación en el gen de la α -actina cardíaca (E101K) en ocho familias provenientes de Suiza, de Alemania y seis familias españolas, las seis gallegas. Asocian por tanto la mutación en una proteína sarcomérica con un fenotipo no compactado. En este estudio describen miembros de una misma familia que presentan diferentes fenotipos que comprenden miocardiopatía hipertrófica apical, hipertrofia biventricular y no compactación y un miembro de la familia al que se le realizó un trasplante debido a una miocardiopatía restrictiva [75]. Estos ejemplos ponen una vez más de manifiesto la heterogeneidad fenotípica de las miocardiopatías tanto en las formas familiares (genéticas) como en las adquiridas. Esta variabilidad conlleva una necesidad creciente de realización de estudios genéticos que ayuden a establecer el diagnóstico en estas patologías.

2.5.2. TRASTORNOS ARRITMOGÉNICOS.

Las autopsias en las que la causa de muerte no ha podido ser establecida incluso tras estudio histológico suponen un desafío tanto para anatomopatólogos como para clínicos y genetistas. La falta de evidencia tras la autopsia puede indicar que la muerte ha tenido lugar como consecuencia de una arritmia cardíaca. Estos trastornos reciben el nombre de canalopatías debido a que las arritmias se generan por defectos en los canales iónicos que regulan el flujo de iones entre el interior y el exterior del miocito. Estas arritmias resultan de la interacción de factores genéticos y

ambientales y pueden dar lugar a muerte súbita. Existe un número creciente de desórdenes arritmogénicos, genéticos y congénitos, con diferentes patrones electrocardiográficos, aunque estas anomalías electrocardiográficas no están siempre presentes o no son evidentes en portadores de mutaciones implicadas en la patología. En general se trata de patologías con baja penetrancia por lo que un estudio genético se hace fundamental en pacientes con historia personal o familiar de muerte súbita cardíaca.

El ciclo cardíaco abarca desde el comienzo de un latido cardíaco hasta el comienzo del siguiente. Cada ciclo comienza con la generación de un potencial de acción a nivel de nodo sinusal, situado próximo a la desembocadura de la vena cava superior, en la parte superior de la pared lateral de la aurícula derecha desde donde se propaga, a través de ambas aurículas, al nodo aurículo-ventricular. Se produce la contracción de las aurículas y el potencial continúa propagándose a lo largo del haz de Hiss, que se extiende desde este nodo aurículo-ventricular al interior del septo intraventricular por medio del esqueleto fibroso. Es en el septo interventricular donde el haz se divide en sus dos ramas, izquierda y derecha y el potencial se transmite con rapidez a la parte apical de ambos ventrículos. A través de las fibras de Purkinje el potencial se transporta a las paredes ventriculares. El rápido transporte produce una sincronización en la contracción del ventrículo de forma que ésta se produce al unísono e imparte fuerza al bombeo de la sangre. Este proceso es posible gracias a la acción coordinada de los miocitos. Las células musculares cardíacas o miocitos representan en torno al 75% de las células cardíacas. Se trata de células con capacidad de generar de forma espontánea el impulso eléctrico y propagarlo a las células adyacentes que responden a este impulso eléctrico (a partir del nodo sinusal y nodo aurículo-ventricular como hemos visto).

El latido cardíaco se inicia por un flujo de señales eléctricas que reciben el nombre de “potencial de acción” y que es provocado por cambios coordinados en la conductancia de iones a través de canales iónicos de la membrana del sarcolema, principalmente de iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . A grandes rasgos, la conductancia de un ión es un índice de la permeabilidad de la membrana hacia dicho ión. El potencial de acción cardíaco consta de cinco fases numeradas de la “0” a la “4” cada una de ellas asociada al cambio en la conductancia frente a uno o más iones específicos. Encontramos dos tipos de potenciales de acción en el corazón: potenciales de acción de respuesta lenta y potenciales de acción de respuesta rápida.

El potencial de respuesta rápida se produce en las fibras especializadas en la conducción (fibras de Purkinje) y en las fibras miocárdicas de aurículas y ventrículos. La fase “4” corresponde a la célula en reposo, es decir, no estimulada (línea basal en torno a los -85 o -90mV) en la que se mantiene hasta que recibe el estímulo de la célula adyacente. Esta fase se corresponde con la diástole. Una vez recibido el estímulo, comienza la fase 0 en la que se produce la despolarización de la membrana debido a un incremento del potencial desde el potencial de reposo a un valor aproximado de $+30\text{mV}$. Este incremento se debe a un aumento en la permeabilidad para iones Na^+ que permite la entrada de estos iones a través de los canales de Na^+ al interior celular debido, por una parte, a un aumento en la conductancia de los canales rápidos de Na^+ y por otra, a la atracción electrostática que impulsa a estos iones a entrar en la célula cuyo interior estaba cargado negativamente. Además el gradiente de concentración transmembrana es alto por lo que el Na^+ entra por difusión al interior celular. Esta entrada de iones Na^+ cesa 1 ó 2 ms más tarde debido a que el potencial se vuelve menos negativo por lo que la fuerza electrostática va debilitándose hasta que se alcanzan valores positivos. Además los canales rápidos de Na^+ se cierran (se inactivan) con rapidez. En la fase “1” comienza la repolarización. Es un periodo breve consecuencia de la

inactivación de los canales rápidos de Na^+ y la apertura de los canales de K^+ . Durante la fase “2” se produce un equilibrio entre la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} tipo L y la salida de K^+ a través de diversos canales rectificadores de K^+ (IKr). En la fase “3” se produce la repolarización final en la que se inactivan los canales de Ca^{2+} y se activan los canales de K^+ (IKs). De nuevo se vuelve al potencial de reposo en fase “4” que depende de la conductancia de la membrana por iones K^+ . Al igual que en el resto de células, la concentración de este ión en el interior de la célula es muy superior a la concentración en el exterior de la misma [76] .

En ocasiones, durante o tras el potencial de acción cardíaco pueden desarrollarse despolarizaciones espontáneas, bien durante fase “2” y/o “3”, o en fase “4” temprana, que generan anomalías en el potencial de acción cardíaca denominadas post-despolarizaciones. Aquellas que ocurren durante la fase “2” y/o “3” del potencial de acción se denominan post-despolarizaciones tempranas o EADs (early afterdepolarization). Las que tienen lugar en la fase “4” temprana reciben el nombre de post despolarizaciones tardías o DAD (delayed afterdepolarization). Ciertas condiciones predisponen al desarrollo de estas post-despolarizaciones que pueden dar lugar a extrasístoles y taquiarritmias. La hipertrofia miocárdica y la prolongación del intervalo QT predisponen al desarrollo de EADs. Estas post-despolarizaciones se han relacionado con la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica en relación con la muerte súbita en la natación.

El potencial de acción de respuesta lenta está presente en el nodo seno – auricular (región marcapasos natural) y el aurículo–ventricular que como vimos conduce el impulso desde las aurículas a los ventrículos. Este potencial de acción, a diferencia del potencial de respuesta rápida, consta de tres fases. La fase “0” de despolarización e inicio del potencial de acción (debido principalmente al aumento en la conductancia del Ca^{2+} a través de los canales tipo L que se abren cuando el potencial de membrana alcanza los -40 mV aproximadamente). Esta despolarización es mucho más lenta que en los canales potenciales de respuesta rápida en que la corriente se produce en los canales de Na^+ . A continuación, se produce la fase “3” de repolarización en que se abren los canales de K^+ hasta que se alcanza el potencial de equilibrio para este ión al tiempo que se cierran los canales de Ca^{2+} para llegar a un valor del potencial de -65 mV, aproximadamente. Seguidamente, tiene lugar la fase “4” en que se produce la despolarización espontánea de forma secuencial hasta que comienza de nuevo la fase “0”. La duración de los factores refractarios relativos y absolutos varía en los potenciales de acción de respuesta rápida y lenta.

Durante el periodo de relajación cardíaca denominado diástole se produce el llenado de sangre del corazón. La contracción cardíaca se denomina sístole. Las válvulas mitral y tricúspide impiden el flujo inverso de sangre de los ventrículos a las aurículas durante la sístole y las válvulas aórtica y pulmonar impiden que regrese a los ventrículos durante la diástole.

Las diferencias de potencial que se generan entre regiones polarizadas y despolarizadas en el corazón dan lugar a una corriente eléctrica que se conduce a lo largo del tiempo y puede ser detectada por electrodos en un electrocardiograma (ECG). El ECG da información rápida de la actividad eléctrica del corazón lo que permite, entre otras funciones como la detección de alteraciones metabólicas, establecer un diagnóstico de patologías cardiovasculares de forma no invasiva. El ECG permite estudiar el ciclo cardíaco mediante el análisis del ritmo cardíaco, conocer la frecuencia cardíaca y obtener datos de bloqueo, de hipertrofia y de isquemia.

En el ECG (esquemático en la figura 10), la onda P representa la difusión de la excitación a través de las aurículas, la contracción auricular. El complejo QRS se corresponde con la difusión

de la excitación a través de los ventrículos, contracción de los ventrículos (despolarización de los ventrículos). Durante la onda Q se produce una corriente horizontal del potencial de acción a través del septo interventricular mientras las ondas R y S se corresponden con la contracción del miocardio. La onda T representa la repolarización de los ventrículos. En cuanto a la onda U, se trata de un fenómeno puramente eléctrico o mecanoeléctrico. Algunos consideran que se debe a la repolarización del sistema His-Purkinje; otros que es causada por la distensión de la pared ventricular durante la diástole (despolarizaciones tardías inducidas), lo que recibe el nombre de hipótesis mecanoeléctrica del origen de la onda U [77].

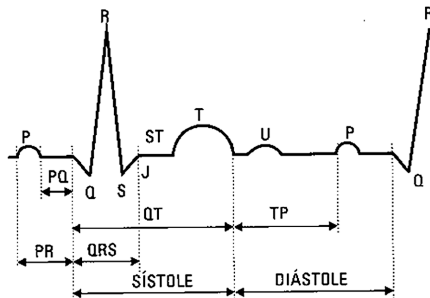


FIGURA 10: Esquema de las ondas generadas por las variaciones del potencial eléctrico captadas en el ECG | Fuente: <http://www.eccpn.aibarra.org/temario/seccion4/capitulo56/capitulo56.htm>

En la figura 11 se muestra el potencial de acción cardíaco y ECG relativo al mismo.

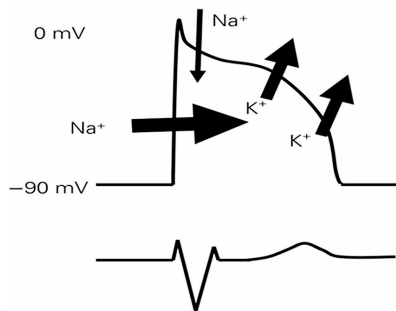


FIGURA 11: Representación simplificada de las corrientes implicadas en el potencial de acción | la entrada masiva de Na⁺ provoca la despolarización de la célula y la salida progresiva de K⁺ devuelve a la célula el potencial de reposo. Se observa el ECG correspondiente a cada una de las fases. Fuente Brugada, J., et al. (2007)[78].

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que regulan el flujo de iones a través de la membrana celular. Se trata de canales selectivos para los diferentes aniones y cationes Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y Cl⁻. Están formados por unidades multiméricas que generalmente están codificadas por genes diferentes. La subunidad α forma el poro y hace de mediador en la corriente de iones, mientras las subunidades β son reguladoras. Defectos en estos canales, debido a mutaciones en los genes que codifican cada una de las subunidades que los forman o mutaciones en proteínas asociadas a estos canales, pueden dar lugar a una alteración o inestabilidad eléctrica en

el corazón que conlleve el desarrollo de canalopatías. La figura 12 representa los canales de K^+ y Na^+ dependientes de voltaje.

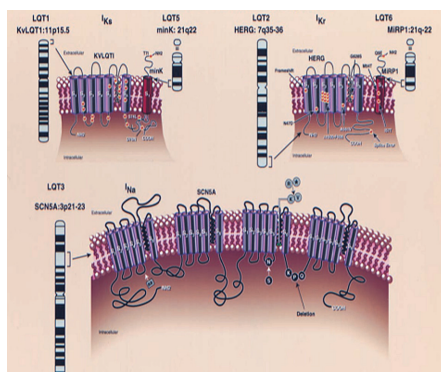


FIGURA 12: Canales de K^+ y Na^+ dependientes de voltaje codificados por los genes KCNQ1, KCNH2 y SCN5A | Fuente: Towbin, JA, (2004) [79].

La generación del potencial de acción o la homeostasis del calcio se ha visto afectada por mutaciones que afectan al flujo de iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Las anomalías electrocardiográficas provocadas por estas canalopatías no están siempre presentes en portadores de una mutación debido a la baja penetrancia que en general tienen todas estas patologías. Las canalopatías son síndromes hereditarios entre los que se encuentran el Síndrome de QT largo, el Síndrome de QT corto, el Síndrome de Brugada, y la Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica.

2.5.2.1 Síndrome de QT Largo.

El Síndrome de QT largo (SQTL) se caracteriza por la prolongación del intervalo QT en el electrocardiograma, es decir, una repolarización ventricular anormalmente prolongada, debido bien a un decrecimiento en la corriente de repolarización del K^+ , bien a un retraso en la entrada de Na^+ al interior del miocito. Las particularidades del ECG en el síndrome de QT largo fueron definidas por Moss y colaboradores hasta que, en el año 2000, Zhang y colaboradores redefinen los parámetros electrocardiográficos de repolarización en el Síndrome de QT Largo congénito [80]. El alargamiento del intervalo QT es responsable de taquiarritmias ventriculares, fallos en la repolarización del miocardio (repolarización cardíaca prolongada) que aumenta la propensión a EADs y éstas al desarrollo de una taquicardia polimórfica ventricular característica, que recibe el nombre de *Torsade des Pointes (TdP)*. Estas arritmias pueden dar lugar a síncope o muerte súbita como primer síntoma de la patología. Se trata de una de las principales causas de muerte en jóvenes. La incidencia se estima de entre 1.2000 -1:5000 personas [81]. La penetrancia del SQTL es variable y abarca desde fenotipos sub clínicos con un intervalo QT en el límite y sin arritmias o síncope [82] [83] [84] hasta muerte súbita cardíaca. Encontramos una forma congénita de la enfermedad en torno a un 85% de los casos y una esporádica que se corresponde con un 15% restante [85]. Existe además una forma adquirida en la prolongación del intervalo QT causada principalmente por fármacos, tanto cardiológicos (ej. antiarrítmicos) como por otros medicamentos (ej. antidepresivos) o derivada de un desequilibrio electrolítico. Numerosos factores

están implicados en el desarrollo de un intervalo QT prolongado adquirido (aLQT) en respuesta a fármacos. Entre los factores que influyen en la respuesta individual a los fármacos se encontrarían la biodisponibilidad del fármaco, las interacciones con otros medicamentos que afecten a la misma corriente de repolarización y la presencia de determinados polimorfismos (SNPs) en los que se ha demostrado una influencia significativa en la farmacodinámica y la farmacocinética de ciertos fármacos [86]. Se ha descrito además que la prolongación del intervalo QT puede ser consecuencia de inanición [87]. Los fármacos asociados a la prolongación del intervalo QT se pueden ver en la tabla 3 adjunta. Cabe destacar que la prolongación del intervalo QT puede ser además consecuencia de alguna anomalía cardíaca estructural [81] aunque este aumento parece estar relacionado con el grado de hipertrofia más que con el riesgo de muerte súbita [88] [89].

La figura 13 muestra un ejemplo del posible efecto de mutaciones en el gen SCN5A sobre el potencial de acción cardíaco y el ECG relativo al mismo.

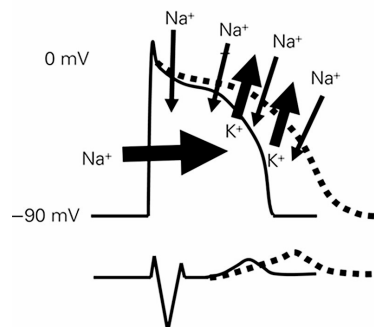


FIGURA 13: Representación simplificada del posible efecto de mutaciones en SCN5A que provoca la ganancia de función del canal de Na^+ y permite que persista la entrada de iones Na^+ que desajusta la salida de K^+ y resulta en la prolongación del tiempo requerido para el restablecimiento del potencial de acción, dando lugar, como se muestra, a la prolongación del intervalo QT característico del SQTL. | Fuente: Brugada, J., et al. (2007) [78].

ANTIARRÍTMICOS
QUINIDINA HIDROCLORURO DE PROCAINAMIDA FOSFATO DE DISAPIRAMIDA HIDROCLORURO DE SOTALOL AMIODARONA FUMARATO DE IBUTILIDA DOFETILIDA PROPAFENONA
ANESTÉSICOS /ANTIASMÁTICOS
DROPERIDOL ADRENALINA
ANTIBIÓTICOS
CLARITROMICINA ERITROMICINA PENTAMIDINA TRIMETOPRIM- SULFAMETOXAZOL KETOCONAZOL FLUCONAZOL
ANTIISTAMÍNICOS
TERFENADINA DIPENHIDRAMINA
ANTIHIPERLIPIDEMIA
PROBUCOL
MEDICAMENTOS ACTIVOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL
DROPERIDOL HALOPERIDOL PIMOZIDA RISPERIDONA
ESTIMULANTES GASTROINTESTINALES
CISAPRIDA

TABLA 3: Selección de medicamentos implicados en la prolongación del intervalo QT | Fuente: Fuster, V. O´Rourke, Walsh, Poole – Wilson, King III, Roberts, Nash, Prystowsky (2008), Hurst´s The Heart. 12 th edition. Mc Graw Hill [86].

El valor del intervalo QT corregido QTc se calcula mediante la fórmula de Bazzet $QT_c = \frac{QT}{\sqrt{RR}}$ [90]. Se consideran anormalmente prolongados los valores de QTc que superan los 440 ms en hombres y los que superan los 460 ms en las mujeres (valores corregidos por el ritmo cardíaco). Además de la prolongación del intervalo QT, las anomalías en ST-T son frecuentes y proporcionan un dato más en el diagnóstico de esta patología.

Se estima que un paciente con un intervalo QTc de 550 ms presenta un riesgo de padecer un evento cardíaco un 63% superior al de un individuo con un valor de intervalo QTc de 450 ms.[91].

La forma congénita del SQT se debe principalmente a mutaciones en los genes que codifican proteínas de los canales de Na⁺ y K⁺. Existen dos patrones de herencia fundamentales en el SQT: uno autosómico dominante que da lugar al Síndrome de Romano-Ward y otro autosómico recesivo que origina el Síndrome de Jervell Lange-Nielsen, que cursa con sordera congénita. Como veremos, hasta el momento se han descrito 12 genes implicados en la patología. Los más frecuentes son los genes que codifican para canales de K⁺, KCNQ1, KCNH2 que representan en torno al 40-55% y 35-45% de los casos respectivamente y el gen SCN5A que codifican para canales de Na⁺ que representa entre un 2-8% de los casos [81]. La afectación de cada uno de estos genes da

lugar a fenotipos clínicos definidos, de manera que el gen KCNQ1 da lugar al SQT1 tipo 1 (LQT1); KCNH2 da lugar al SQT2 tipo2 (LQT2) y SCN5A da lugar al SQT3 (LQT3).

El diagnóstico clínico se lleva a cabo siguiendo el criterio de Schwartz que se adjunta en la tabla 4 [92]. Este criterio, que data de 1993, ha recibido críticas por no incluir el estudio genético como herramienta de apoyo al diagnóstico [93]. Pese a que existen otros criterios como, por ejemplo, el de Keating, el criterio Schwartz es aún considerado como una herramienta importante en la práctica clínica.

CRITERIOS SCHWARTZ PARA EL DIAGNÓSTICO DE QTL	
HALLAZGOS ECG ^{*1}	PUNTOS
A.	
QTc	3
≥ 480 ms ^{1/2}	2
460 – 470 ms ^{1/2}	1
450 (hombres)	
B.	
Torsades de pointes.	2
C.	
Ondas T alternas.	1
D.	
Muecas en onda T en tres derivaciones.	1
E.	
Frecuencia cardíaca baja para la edad. ^{*2}	0,5
HISTORIA CLÍNICA	
A.	
Síncope ^{*3}	2
Con estrés	1
Sin estrés.	
B.	
Sordera Congénita	0,5
HISTORIA FAMILIAR	
A.	
Miembros de la familia con SQT1 confirmado	1
B.	
MSC no explicada en un familiar inmediato > 30 años	0,5

TABLA 4: Criterios Schwartz para el diagnóstico del SQT1 (adaptada). | Fuente: Hedley et al. (2009)[81]. *1: En ausencia de medicamentos o enfermedades que puedan afectar al ECG. *2: Ritmo cardíaco medido en descanso.*3: Excluyentes mutuamente. Se considera baja probabilidad de SQT1 si se alcanza una puntuación ≤ 1 punto. Una probabilidad intermedia se define por una puntuación de 2 a 3 puntos. Si se alcanzan al menos 4 puntos la probabilidad de SQT1 se considera alta.

2.5.2.2 **Síndrome de QT corto.**

El síndrome de QT corto (SQT) se ha reconocido, recientemente, como una entidad clínica definida caracterizada por un intervalo QT acortado que puede dar lugar a arritmias y a muerte súbita cardíaca [94] (figura 14). Sin embargo, las estrategias terapéuticas, características clínicas y la relación genotipo-fenotipo aún no están bien definidas [86] . En estos pacientes la onda U coincide en el ECG, con el cierre de la válvula aórtica y la relajación isovolumétrica. Éste hecho apoyaría la hipótesis mecanoeléctrica de la onda U en el ECG. La onda T es característica en el SQT ya que se presentan en el ECG como ondas altas, picudas y simétricas [95] .



FIGURA 14: ECG de un paciente con SQTC tipo 1. | Se aprecia la separación de las ondas T y U. Valor QT 260 ms, QTc 283 ms, velocidad del papel 50 mm/s, amplitud 20 mm/mV. Fuente: Schimpf, R., et al. (2008) [77].

Se considera que un acortamiento del intervalo QT no es suficiente para determinar que el paciente padezca el síndrome de QT corto [96]. Sin embargo este hecho sumado a que se presente como forma familiar (historia familiar de muerte súbita), que haya tenido lugar algún evento cardíaco como fibrilación ventricular o auricular, palpitación sostenida y/o síncope debe hacer sospechar SQTC [77] [81]. Estos síntomas pueden presentarse a cualquier edad, incluso en neonatos en el primer año de vida en los que se ha descrito muerte súbita. Un acortamiento inexplicable del intervalo QT en recién nacidos debe ser por tanto estudiado como causa potencial de SMSL [77]. No hay un consenso en la definición del valor límite de QTc corto. En un principio se asumió que el valor del intervalo QT considerado como corto era <300 ms [94] [95]. Los primeros pacientes con QT corto (tipo1, 2 y 3) presentaban un QTc menor de 320ms. Sin embargo, al igual que en SQTl, la zona de transición de los intervalos QT normales a los patológicos es complicada de establecer [77]. Se acepta que valores del intervalo QT comprendidos entre 320ms y 340 ms son cortos (pese a que 340ms podría ser considerado normal) si existen antecedentes de síntomas cardíacos como síncope o muerte súbita recuperada.

Alguno de los genes previamente descritos como causales de SQTl se han visto como también implicados en SQTC: en la primera familia en que se describió una mutación en el gen *KCNH2*, ésta implicaba la ganancia de función en los canales I_{Kr} [97]. Además de *KCNH2*, se ha visto que *KCNQ1*, *KCNJ2* y *CACNA1C* también son comunes en ambas patologías, de modo que el efecto funcional de la mutación sobre la proteína (pérdida o ganancia de función) es lo que determina el tipo de canalopatía desarrollada. En el SQTC, las mutaciones en los genes que codifican para los canales de K^+ : *KCNH2*, *KCNQ1* y *KCNJ2*, provocan una ganancia de función de éstos canales y dan lugar al SQTC1, SQTC2 y SQTC3 respectivamente. En el SQTC1 se produce la

ganancia de función de la subunidad α del I_{kr} ; en SQTC2 se produce la ganancia de función de la subunidad α del I_{ks} y en SQTC3 se produce la ganancia de función de la subunidad α del I_{kl} . Sin embargo, las mutaciones en los genes que codifican para las subunidades α y $\beta 2$ del canal Cav1.2 que conduce la despolarización por las corrientes de Ca^{2+} tardía, CACNA1C y CACNB2, provocan la pérdida de función de dichos canales y dan lugar a los SQTC4 y SQTC5 respectivamente con fenotipo similar al síndrome de Brugada [81].

2.5.2.3 Síndrome de Brugada.

Descrito en 1992, el Síndrome de Brugada (SBr) se caracteriza por una elevación del segmento ST en las derivaciones precordiales derechas (v1-v3) [185]. Puede asociarse además a aumento de intervalo PR y bloqueo de rama. Está asociado al desarrollo de taquicardia ventricular polimórfica y/o fibrilación ventricular y muerte súbita. La arritmia puede desencadenarse en reposo (sin aparente relación con una variación del sistema nervioso autónomo) o bajo estrés.

La distribución e incidencia de esta patología es difícil de precisar debido, por un lado, a que sus manifestaciones electrocardiográficas no están siempre presentes en pacientes que, sin embargo, sí padecen la patología y, por otro, por tratarse de un síndrome de descripción bastante reciente. Se estima que el SBr es responsable de más de un 12% de los casos de muerte súbita cardíaca y del 20% del las muertes en pacientes con un corazón estructuralmente normal. En algunos casos se han descrito ligeras alteraciones estructurales en individuos con SBr [98] [99]. La estima de la prevalencia de la patología se ha realizado en estudios poblacionales en los que se han alcanzado valores de 0.05 en Europa y 0.4 en Japón [100] [101]. Campuzano y colaboradores estiman una prevalencia de aproximadamente 35/100000 personas/año y afirman que, pese a que los síntomas suelen desarrollarse en torno a los 40 años de edad, la muerte súbita puede afectar a individuos de cualquier edad y calculan un porcentaje en varones de un 75%. Estiman que entre un 20 y un 50% de los afectos tienen historia familiar de muerte súbita [102].

Diferentes factores ambientales pueden modular el fenotipo del SBr. El electrocardiograma se normaliza en aproximadamente un 40% de los pacientes, por lo que puede pasar inadvertido, ser intermitente o permanecer oculto. El aumento de temperatura provoca la aparición del patrón electrocardiográfico propio del SBr por lo que un episodio de fiebre puede dar lugar al desarrollo de este patrón y desaparecer éste al remitir la fiebre. Lo mismo ocurre con ciertas drogas (ej. cocaína). En estos casos el tratamiento con Flecaína, Procainamida o Ajmalina es utilizado para desenmascarar la patología en el electrocardiograma.

El patrón de herencia predominante de la patología es autosómico dominante con expresión probablemente dependiente de la edad y penetrancia incompleta. La expresividad de esta patología es variable y cabe destacar que se encuentran fenotipos “mixtos”: en una misma familia podemos encontrar miembros afectados de SBr, SQTL, fibrilación atrial, SQTC, defectos en la conducción o enfermedades cardíacas estructurales [103]. La primera mutación identificada se describió en 1998 en el gen SCN5A que codifica la subunidad α del canal de sodio [104]. Desde entonces, mutaciones en otros genes se han descrito como responsables de esta patología, algunos relacionados con el canal de sodio: Nav1.5, GPD1-L y otros independientes del canal de sodio como el gen CACNA1C que codifica el canal de calcio tipo L, o su subunidad $\beta 2b$ (CACNB2b) en pacientes con SBr y con un patrón de intervalo QT corto en el electrocardiograma [105]. En un principio se describieron tres tipos de SBr con diferentes patrones electrocardiográficos. Así el SBr tipo 1 que afecta a SCN5A presenta elevación del segmento ST curvado hacia arriba ≥ 2

mm seguida de una onda T negativa; el tipo 2, con elevación del segmento ST y punto J ≥ 2 mm con morfología en «silla de montar», seguido de una onda T positiva, y tipo 3, con elevación del segmento ST y punto J < 1 mm y morfología variable tipo cóncavo o tipo en «silla de montar» [106]. Hoy ya se han descrito más de 100 mutaciones en siete genes diferentes que dan lugar a los siete tipos de SBr. Estos genes codifican tanto proteínas de los canales de Na^+ como de diferentes canales iónicos (Tabla 5). Las mutaciones afectan al correcto desarrollo de las fases “1” y “2” del potencial de acción [103] (figura 15).

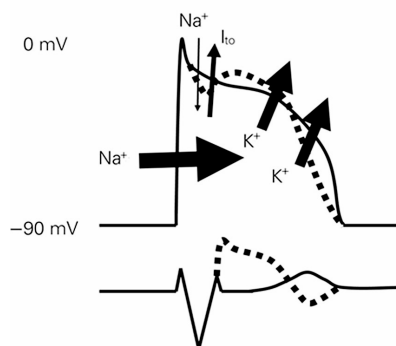


FIGURA 15: Representación simplificada del potencial de acción y el ECG del SBr. | Se produce una pérdida entre el equilibrio de entrada de Na^+ y salida de K^+ en la fase I. Se produce una despolarización prematura. El ECG resultante es el característico del SBr. Fuente Brugada, J., et al. (2007) [78].

Se estima que entre un 20 y un 25% de los pacientes afectados de SBr presentan mutaciones en el gen *SCN5A* [107] que representa, además, entre el 5-10% de las mutaciones encontradas en casos de muerte súbita cardíaca en adultos y niños [103]. Se han descrito más de 200 mutaciones que provocan la pérdida de función de los canales de Na^+ mediante diferentes mecanismos [104] [107] [108] [109] [110] [111] [112] [113]

Se han encontrado mutaciones en el gen *SCN5A* que explicaban la muerte súbita nocturna, una patología predominante en varones del sureste asiático (ej. Tailandia, Japón, Filipinas y Camboya). Las muertes se producen por taquicardia – fibrilación ventricular durante el sueño. Se ha visto que se trata de la misma patología que el SBr tanto a nivel fenotípico como genético y funcional [114].

La implantación de un desfibrilador automático (DAI) se lleva a cabo tanto en pacientes que presentan síntomas como en pacientes a los que se les induce la arritmia.

PROTEÍNA CODIFICADA ¹	SÍMBOLO DEL GEN ²	LOCUS ³	TIPO DE SBr ⁴	FRECUENCIA MUTACIONES ⁵	CANAL IÓNICO ⁶	EFFECTO DE LAS MUTACIONES ⁷
Proteína NaV1.5	SCN5A	3p21	SBr 1	20-30%	Subunidad α I _{Na}	PÉRDIDA DE FUNCIÓN
G3PD1L	GPD1L	3p24	SBr 2	Rare	Interactúa con Subunidad α I _{Na}	PÉRDIDA DE FUNCIÓN
Canal de Calcio tipo L	CACNA1C	12p13.3	SBr 3	?	Subunidad α I _{Ca}	PÉRDIDA DE FUNCIÓN
Canal de Calcio tipo L subunidad β 2	CACNB2	10p12.33	SBr 4	?	Subunidad β I _{Ca}	PÉRDIDA DE FUNCIÓN
Canal de Sodio β 1	SCN1B	19q13.1	SBr 5	?	Subunidad β I _{Na}	GANANCIA DE FUNCIÓN
MIRP2	KCNE3	11q13-q14	SBr 6	?	Subunidad β I _{Ks} /I _{To}	PÉRDIDA DE FUNCIÓN
Canal de Sodio β 3	SCN3B	11q23.3	SBr 7	?	Subunidad β I _{Na}	PÉRDIDA DE FUNCIÓN

TABLA 5: Genes implicados en el desarrollo del SBr. | *1,2,3,4 y 5: Fuente : Allegue et al (2010). [115]*6 y 7: Fuente: Hedley et al. (2009). [103]SBr(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7): Síndrome de Brugada (tipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7)}.

2.5.2.4 Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica.

En 1978 Coumel y colaboradores describen la Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica (TVPC) en cuatro niños con síncope provocado por la práctica de ejercicio o por una emoción intensa. Presentaban un patrón característico de taquicardia bidireccional o polimórfica relacionada con el estrés, sin anomalía cardíaca estructural [116]. Desde entonces se han realizado diferentes estudios en pacientes con el mismo perfil clínico hasta que en 2001 se propone que mutaciones en el gen del receptor cardíaco de rianodina (Ryr2) podría dar lugar a defectos heredables en el intercambio de calcio en el miocito [117]. Las manifestaciones clínicas se dan con frecuencia durante la niñez y adolescencia.

La TVPC presenta dos modos de herencia: autosómica dominante y recesiva. La forma autosómica dominante es causada por mutaciones en el gen Ryr2 que codifica el receptor de rianodina, una proteína de gran tamaño que forma el canal de liberación de calcio en el retículo sarcoplásmico. Es fundamental en la regulación tanto de la contracción y la relajación como del nivel de calcio intracelular. La forma recesiva de la enfermedad es causada por mutaciones en la isoforma cardíaca del gen de la calquestrina (CASQ2), la cual se une al receptor de rianodina y participa en el control de la excitación-contracción.

Aunque se trata de una patología rara y letal, se han obtenido buenos resultados tras un diagnóstico temprano y un tratamiento adecuado con β -bloqueantes adrenérgicos y la implantación de un DAI. La mortalidad, cuando la patología no es tratada a tiempo, gira alrededor del 30-50%, en torno a los 40 años de edad [118] . Se han descrito además casos de muerte súbita del lactante en los que se encontraron mutaciones en el gen Ryr2 [119].

Un 70% de los pacientes presentan una mutación en Ryr2 con una penetrancia promedio de un 80% [118]. Se debe considerar el estudio de genes implicados en la TVPC en aquellos casos en que la muerte súbita tiene lugar durante la natación [120].

2.5.3. **SÍNDROME DE LA MUERTE SÚBITA DEL LACTANTE.**

La mortalidad infantil continúa siendo un grave problema de salud pública pese a los avances en la medicina perinatal y en la de neonatos. Las causas de muerte en bebés son múltiples: nacimiento prematuro, bajo peso al nacer, patologías congénitas o el síndrome de la muerte súbita del lactante. Estas patologías resultan de una compleja interacción entre factores genéticos y ambientales.

La muerte repentina e inexplicada tras autopsia de un bebé en su primer año de vida recibe el nombre de Síndrome de la Muerte Súbita del Lactante (SMSL). Ocupa el tercer lugar en las causas de muerte durante la infancia [121] y su incidencia, aunque resulta muy complicada de establecer, se estima en torno a 0,57 y 0,41/1000 nacimientos, en Reino Unido y Estados Unidos respectivamente [122], (report: Unexplained Deaths in Infancy, 2005). En España no disponemos de datos fiables y las estadísticas son muy dispares estimándose una incidencia de entre 0.2 y 0.3/1000 nacidos vivos [123].

Además de los factores ambientales -tales como la posición del bebé durante el sueño, la exposición del bebé al humo del tabaco o el tabaquismo materno durante la gestación-, se han estudiado diversos factores genéticos como potencialmente responsables de esta patología. Éstos incluyen genes que codifican proteínas de los canales iónicos, gen del transportador de serotonina, genes de la diferenciación y desarrollo del sistema nervioso central, genes que codifican enzimas metabolizadoras de nicotina, genes implicados en procesos inflamatorios, implicados en la producción de energía, en la hipoglucemia y en la regulación térmica y, por último, genes que codifican proteínas sarcoméricas.

Veremos el papel de cada uno de ellos en el sub apartado referente a la muerte súbita del lactante dentro de la genética de la muerte súbita.

3. GENÉTICA DE LA MUERTE SÚBITA CARDÍACA.

Estudios previos demuestran que el examen cardíaco y el estudio genético de familiares, especialmente en familiares de individuos jóvenes que fallecen súbitamente, combinado con el análisis post mortem aumenta la capacidad diagnóstica, con una tasa de acierto comparable al análisis de personas que sobreviven tras una muerte súbita recuperada [124]

En el caso de atletas, los reconocimientos médicos son con frecuencia ineficaces en la prevención de la muerte súbita. Los costes de las pruebas clínicas son elevados de modo que la aplicación en la evaluación clínica de rutina en deportistas de alto nivel es objeto de debate [125] [126]. El estudio genético comienza a ser una alternativa en este grupo de población, especialmente en individuos con historia familiar de MSC o en aquellos deportistas en que no se identifica la causa de síntomas cardíacos tales como síncope de repetición. Suárez-Mier y Aguilera publican en 2002 un estudio sobre las causas de muerte asociada al deporte en España. Concluyen que en deportistas menores de 30 años la causa de muerte súbita más común son la hipertrofia ventricular izquierda severa y la miocardiopatía arritmogénica. Un 30% de las muertes no pudieron ser explicadas. En mayores de 30 años la enfermedad ateromatosa coronaria asociada al ciclismo fue la causa predominante [127].

Jouven y colaboradores llevan a cabo un estudio en el que participan 7746 varones de mediana edad (43-52 años) asintomáticos, a los que se les hace un seguimiento durante 23 años. Concluyen que el riesgo de MSC es el doble si uno de los progenitores tiene una historia personal de muerte súbita y nueve veces superior si ambos progenitores la tienen (estos últimos casos son poco comunes n=19) [128].

Se han realizado numerosos estudios genéticos de síndromes familiares monogenéticos que tratan de esclarecer la susceptibilidad genética a torsade de pointes y/o a MSC.

3.1. MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA FAMILIAR.

Se han descrito un gran número de mutaciones implicadas en el desarrollo de la MCH; sin embargo, la frecuencia de las mismas es muy baja hasta el punto de tratarse muchas veces de “mutaciones privadas” en familias. Algunos autores, sin embargo, afirman que en el estudio genético de un grupo de pacientes que sufren MCH, más de un 50% (incluso citan 70%) de las mutaciones patogénicas de las que son portadores ya han sido descritas previamente [129]. Este elevado número de mutaciones y de genes implicados y el elevado número de genes en estudio, dificulta el análisis genético en esta patología de gran heterogeneidad no solo alélica (múltiples mutaciones en un gen) y de locus (mutaciones en dos o más genes), sino también fenotípica incluso en portadores de una misma mutación. En la figura 16 se recogen de forma esquemática los principales genes descritos como implicados en el desarrollo de las diferentes patologías así como el solapamiento entre ellos.

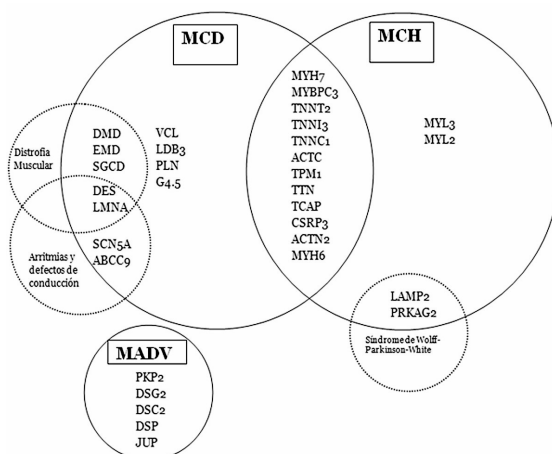


FIGURA 16: Heterogeneidad genética y solapamiento genético en los principales genes implicados en el desarrollo de miocardiopatías. Adaptada de Van Spaendonk-Swartz et al.,(2008)[130].

3.1.1. **EPIDEMIOLOGÍA GENÉTICA.**

Como hemos visto, la MCH es una enfermedad con un modo de herencia autosómico dominante. Sin embargo, cabe destacar que los varones representan entre un 60 y un 70% de los casos mientras que las mujeres tienen más síntomas que los varones [131]. En muchos pacientes con MCH no se ha podido comprobar la naturaleza familiar de la enfermedad tal vez debido al número de familiares estudiados, a su edad (por ejemplo individuos jóvenes sin desarrollo de la MCH en el momento del examen clínico), a los criterios diagnósticos utilizados o a la severidad del fenotipo. Sin embargo se acepta que la presentación es familiar en un alto porcentaje de los pacientes. Estudios poblacionales estiman que la tasa de mortalidad anual por MCH se encuentra entre un 2 y un 4% [132] [133] y por encima del 6% en niños [134]. Estudios más recientes establecen una tasa de mortalidad menor de un 1% en población general [135] [136].

La penetrancia de la patología es dependiente de la edad por lo que el fenotipo puede no estar presente en portadores considerados asintomáticos. El seguimiento clínico debe llevarse a cabo de manera sistemática en los familiares asintomáticos, ya que existen mutaciones con penetrancia incompleta, es decir, mutaciones que no producen (o no se detectan) manifestaciones clínicas en los todos los portadores. La existencia de individuos afectados con dobles y triples mutaciones podría explicar que familiares que no hayan heredado todas ellas no desarrollen la patología. Las interacciones entre rutas metabólicas son objeto de estudio. Marian y colaboradores afirman que la hipertrofia cardíaca en la MCH es consecuencia de la activación, debida a mutaciones causales en proteínas sarcoméricas, de rutas de señalización. Explican que estas mutaciones afectan a la estructura y al nivel de expresión de la proteína sarcomérica por lo que se ven alteradas tanto las funciones moleculares y celulares como la interacción actina-miosina y la actividad ATPasa. Los defectos funcionales inician una cascada de procesos como la activación de rutas de señalización en la hipertrofia cardíaca y la expresión de marcadores moleculares de hipertrofia cardíaca, que dan lugar a los fenotipos intermedios. El fenotipo sería consecuencia de la interacción entre rutas moleculares intermediarias en el contexto en que operan así como de factores ambientales [44].

Las causas genéticas de la MCH comenzaron a ser estudiadas tras la observación de que existían formas familiares de la patología. Así pues, se realizaron estudios de ligamiento en familias a fin de localizar regiones genéticas en que podrían estar las mutaciones implicadas en MCH. El problema de los estudios de ligamiento es la dificultad de trabajar con muestras de ADN de varias generaciones en familias numerosas con individuos afectados y sanos. En dichas familias además el diagnóstico debe ser concreto. Otra dificultad es la posibilidad de que la penetrancia sea incompleta en alguna de las mutaciones. Se trata además de estudios complicados en cuanto a la técnica y al gasto económico que conllevan. Este problema se solventa a medida que se desarrollan nuevas estrategias de genotipado a gran escala y técnicas de análisis de genomas completos por medio de las nuevas tecnologías de biología molecular aplicadas, tanto al estudio de familias como a la búsqueda de genes candidatos. Tras la detección de variantes genéticas en estos genes candidatos, es necesario descartar la misma en población general y estudiar la cosegregación con la enfermedad para que sea considerada una mutación patogénica y no una variante no patogénica o un polimorfismo en la población. Los estudios funcionales y en modelos animales así como las aproximaciones por modelos bioinformáticos de predicción de la posible patogenicidad de la variante encontrada son herramientas muy útiles y fundamentales para la comprensión del posible efecto fenotípico de dicha variante en humanos. El creciente número de mutaciones que se describen constantemente en la bibliografía como implicadas en el desarrollo de MCH provoca que el estudio en animales o estudios funcionales en proteínas sean cada vez más complicados así como cada vez más necesarios para comprender los posibles efectos funcionales de las variantes genéticas.

Desde la descripción de la primera mutación, una mutación *missense* implicada en el desarrollo de MCH, detectada en la cadena pesada de la β -miosina en una familia franco-canadiense en 1990 [137], se han descrito numerosas mutaciones en genes que codifican proteínas sarcoméricas, mayoritariamente en los filamentos gruesos seguidas por mutaciones en los filamentos finos y, algo menos comunes o tal vez menos estudiados, en el disco Z. Los genes implicados en la patología se recogen en la tabla 6. Se considera que un tercio de genes causales de la MCH no han sido aún identificados, mientras los genes conocidos explican los dos tercios restantes de los casos de MCH [44]. Mutaciones en los genes que codifican para la cadena pesada de la β -miosina (MYH7) y la proteína C de unión a miosina (MYBPC3) representan en torno a la mitad de los casos de MCH [138] [139] [140]. Tal vez este panorama cambiará a medida que nuevos genes vayan siendo estudiados más en profundidad y se describan nuevos genes implicados. Los avances en la biología molecular agilizan los estudios a gran escala en grandes cohortes de pacientes y permiten identificar regiones afectadas en el genoma por lo que la búsqueda se lleva a cabo de manera muy específica en periodos breves de tiempo, con gran especificidad y costos cada vez más reducidos. Cientos de mutaciones se han visto implicadas en el desarrollo de la patología. Éstas han sido publicadas en multitud de artículos y numerosas bases de datos recogen esta información.

Profundizaremos en aquellos genes incluidos en el estudio genético que hemos desarrollado.

MYH7 (Gene Bank: M58018)

MYH7 codifica la cadena pesada de la β -miosina.

La miosina es una proteína hexamérica formada por dos cadenas pesadas de un peso molecular de 220 Da, aproximadamente, dos cadenas ligeras y dos reguladoras. Las dos cadenas pesadas constan de dos dominios, un dominio o cabeza globular y una cola en α -hélice. La cadena

pesada de la β -miosina es el principal componente del filamento grueso del sarcómero y proporciona la función motora de la contracción cardíaca.

El gen MYH7 fue el primer gen en el que se relacionaron mutaciones con la MCH. Se localiza en el cromosoma 14 (14q12).

Se expresa de forma predominante en el ventrículo, aunque también en el músculo esquelético rico en fibras de contracción lenta. Hasta hoy se han descrito en torno a 300 mutaciones según la base de datos de *The Human Gene Mutation Database at Institute of Medical Genetics in Cardiff* (HGMD). Mutaciones en este gen se han visto relacionadas no sólo con la MCH sino también con miopatías y MCD familiar. La mayoría de las mutaciones descritas en este gen son como cabría esperar, mutaciones puntuales que dan lugar a la sustitución de un aminoácido por otro (mutaciones *missense*) [44] y afectan en su mayoría en la mitad amino terminal, en la región de la cabeza globular de la molécula. Se pueden encontrar mutaciones en zonas con actividad bioquímica hidrolítica como, por ejemplo, en la zona de contacto con la actina. Esta zona se encuentra próxima a la zona con actividad ATPasa dependiente de la actina en la que se aloja el ATP que, al hidrolizarse, libera un enlace fosfórico de alta energía, fundamental para la contracción. Pueden darse además en las zonas con actividad mecánica como en las asas motoras causales del movimiento de torsión o en la zona del convertidor que amplifica el movimiento y permite que la miosina se deslice sobre la actina sin que ésta sufra ninguna flexión.

Se han descrito mutaciones en los lugares de unión de la cadena ligera, en la zona de unión cabeza-cola, así como en algunos lugares de la región de la cola de la molécula. Las mutaciones en MYH7 suelen estar asociadas a una hipertrofia, casi siempre masiva, de predominio septal asimétrica de grado moderado a severo, que suele manifestarse en la adolescencia o en adultos jóvenes y se asocian con una tendencia notable a muerte súbita [129] [141].

Un elevado número de mutaciones están localizadas en los primeros 23 exones, que codifican para el dominio motor y el dominio regulador de la cabeza de la miosina [140].

Se trata de un gen, relativamente grande, formado por 40 exones que dan lugar a una proteína de 1935 residuos aminoácídicos.

MYBPC3(Gene Bank: X84075)

El gen MYBPC3 codifica la proteína C de unión a miosina. Esta proteína se asocia a la miosina en la región C de las bandas A del músculo estriado. El gen MYBPC3, localizado en el cromosoma 11 (11p11.2), codifica la isoforma cardíaca de la proteína C de unión a miosina que se expresa exclusivamente en el músculo cardíaco. Alguno de los dominios propios de la isoforma cardíaca modulan la contracción vía fosforilación por la proteína quinasa A y/o proteína quinasa dependiente de calmodulina. MYBPC3 es el principal componente del filamento grueso y se une tanto a éstos como a la titina. Se encuentra localizada en la región C de la banda A y, como otras proteínas que se unen a la miosina, la proteína C de unión a miosina pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas intracelulares y está compuesta por dominios Ig y fibronectina repetidos.

La organización estructural y la secuencia de la proteína fueron descritas en 1997 por Carrier y colaboradores [142]. Cabe destacar que un número significativo de mutaciones en este gen son

inserciones/deleciones y mutaciones de *splicing* que pueden provocar un desplazamiento de la pauta de lectura y dar lugar a una proteína truncada [44], normalmente en el dominio carboxi-terminal donde se localiza un lugar de unión de la miosina.

Las mutaciones en MYBPC3 aparecen en un 15-25% de los pacientes con MCH. Estas mutaciones son muy frecuentes, tanto como las mutaciones en MYH7 o incluso más [143] [144] [145]. Se considera que las mutaciones en MYBPC3 dan lugar a un fenotipo más leve que las que se producen en otros genes sarcoméricos, con una expresión más tardía, es decir, los portadores pueden no manifestar clínicamente la MCH hasta la cuarta, quinta o sexta década de la vida [146] con presentación incompleta y un perfil clínico relativamente benigno, aunque se han descrito casos con expresión clínica precoz, hipertrofia severa y alto riesgo de muerte súbita [129].

Debido al comienzo tardío, la evolución benigna y la predominancia de individuos asintomáticos con hipertrofia leve, la prevalencia de estas mutaciones podría estar subestimada. Por lo tanto, la detección de pacientes sospechosos de padecer MCH debería incluir pacientes de todos los grupos de edad, incluso a los adultos considerados saludables en evaluaciones clínicas previas [147].

El gen MYBPC3 codifica una proteína de 1274 residuos aminoácidos y lo componen 35 exones.

MYL2 (Gene Bank: NM 000432) y MYL3 (Gene Bank: NM 000258)

Codifican la Cadena ligera reguladora y esencial de la miosina.

Al dominio regulador de la cabeza de la miosina se unen dos tipos de cadenas ligeras, la cadena reguladora y la cadena esencial. Son proteínas pequeñas que desempeñan papeles reguladores y estructurales. Estabilizan el cuello en α -hélice de la miosina modificando así su rigidez. Pertenecen a la superfamilia de las proteínas “EFhand”, que incluye la calmodulina y la troponina C [148].

La idea de que los genes MYL2, localizado en el cromosoma 12 (12q24.11) y MYL3, localizado en el cromosoma 3 (3p21.3-p21.2) que codifican la cadena ligera reguladora y esencial de la miosina respectivamente podrían estar implicados en el desarrollo de MCH surge de que un grupo importante de mutaciones de MYH7 se localizaban muy próximas a los dominios involucrados en la unión a las cadenas ligeras, lo que sugería que esta región podría ser una zona crítica para el funcionamiento normal de las proteínas motoras [148]. Hoy, ya se han establecido como genes causales de la patología [44]. Sin embargo, su frecuencia es muy baja (probablemente menor al 1% entre ambos genes) y están asociados a una hipertrofia ligera pese a que alguna de las mutaciones descritas se han asociado a alto riesgo de muerte súbita [129].

El gen MYL2 consta de siete exones que codifican los 166 residuos aminoácidos que componen la cadena reguladora. Ésta puede ser fosforilada a través de la vía de la proteína quinasa A, implicada en la contracción (el Ca^{2+} provoca la fosforilación de la cadena ligera reguladora y comienza la contracción).

El gen MYL3 consta de siete exones que codifican los 195 residuos aminoácidos que componen la cadena.

Mutaciones en las cadenas ligeras de la miosina cardíaca dan lugar a una hipertrofia masiva de los músculos papilares, columnas carnosas ubicadas en las paredes internas de los ventrículos cardíacos, y del tejido ventricular adyacente [149].

Troponinas cardíacas: **TNNT2**(Gene Bank: X74819); **TNNI3**(Gene Bank: M64247); **TNNC1**(Gene Bank: M64247) .

TNNT2 codifica la Troponina T cardíaca, **TNNI3** codifica la Troponina cardíaca I, y **TNNC1** codifica Troponina cardíaca C.

Las troponinas cardíacas son fundamentales en el inicio y la regulación de la contracción cardíaca. Las troponinas cardíacas T, I y C son codificadas por los genes TNNT2, localizado en el cromosoma 1 (1q32), TNNI3 en el cromosoma 19 (19q13.4) y TNNC1 en el cromosoma 3 (3p21.3-p14.3) respectivamente.

Mutaciones en TNNT2 y en TNNI3 se han asociado con MCH aunque se ha visto que hay mutaciones en estos genes implicados en el desarrollo de MCD y, en el caso de TNNI3, con miocardiopatía restrictiva. Mutaciones en TNNC1 se han visto implicadas en MCH y MCD. La característica más destacable es que mutaciones en troponinas cursan con hipertrofia ligera con fenotipo leve y sin embargo presentan un elevado riesgo de disfunción sistólica con insuficiencia cardíaca y/o muerte súbita en los portadores, hecho que se ha asociado a la presencia de desorganización miofibrilar severa. Ciertas mutaciones cursan con un fenotipo severo, principalmente hipertrófico, mutaciones que cursan con hipertrofia de desarrollo tardío y mutaciones con bajo riesgo. Las mutaciones en los genes de las troponinas aparecen en un 5 a 10% de los casos de MCH, aunque en la TNNC1 es menos frecuente [129], tal y como se muestra en la tabla 6.

El gen TNNT2 codifica la subunidad de unión a tropomiosina del complejo de las troponinas. Regula la contracción en respuesta a variaciones de concentración de Ca^{2+} intracelular.

En 1996 Forissier y colaboradores relacionan mutaciones en TNNT2 con el desarrollo de MCH. Desde entonces se describen de manera precisa mutaciones en los exones de este gen, incluso mutaciones que se procesan de forma alternativa durante el desarrollo. TNNT2 da lugar a cuatro isoformas cardíacas de la troponina T que difieren en el tamaño final de la proteína a que dan lugar; así, la proteína codificada por la isoforma 1 es la de mayor tamaño, la isoforma 2 da lugar a una proteína con un segmento interno menos y la 3 y 4 tienen dos segmentos menos que la isoforma 1. El gen está formado por 16 exones que dan lugar a las isoformas de la troponina mediante el uso de exones y de sitios aceptores alternativos.

La isoforma cardíaca de TNNT2 comparte la estructura completa y la función de otras isoformas de troponina. Se trata de una molécula asimétrica de aproximadamente 35 kDa. La proteína desempeña un papel estructural importante al colocar al complejo de troponina a lo largo del filamento delgado. Además, confiere sensibilidad al calcio a la actividad inhibitoria del complejo formado por las troponinas cardíacas I/C sobre la ATPasa de la actomiosina [148].

Las mutaciones descritas en TNNT2 se distribuyen a lo largo de toda la molécula. La presentación clínica de estas mutaciones es muy similar en todos los casos: se caracteriza por una hipertrofia indetectable, leve o moderada, penetrancia incompleta y una tendencia muy alta a la muerte súbita en la adolescencia o en adultos a edades tempranas. Se trata de mutaciones espe-

cialmente malignas como se demuestra en el caso presentado por Varnava y colaboradores en 1999. Describen la mutación R94L, que produce un cambio en la carga y en la conformación de la proteína. Deducen que la hipertrofia puede no ser el factor que determine la muerte súbita en la MCH y, en lugar de ello, lo sea el desarreglo de la miofibrilla asociado con la fibrosis. En 1999 se describe la mutación R278C en un paciente de 67 años de edad que, 10 años atrás, era asintomático desde el punto de vista clínico y electrocardiográfico. Hasta ese momento todos los casos conocidos habían comenzado en la adolescencia. Se concluye que esta mutación puede llegar a manifestarse tardíamente, justificando los casos de muerte súbita en la edad adulta, en individuos asintomáticos, con una hipertrofia ventricular leve o normal [148].

La **Troponina I** es la subunidad inhibidora del complejo de las troponinas que bloquea la interacción entre la actina y la miosina y media la relajación muscular.

TNNI3 codifica la troponina I cardíaca, que se expresa exclusivamente en el músculo cardíaco. Ésta posee un extremo amino-terminal de 33 aminoácidos que no tienen las formas esqueléticas. Se une a la actina e impide la actividad ATPasa de la miosina. La inhibición por esta unidad se vuelve reversible en presencia de Ca^{2+} , que se une a la troponina C e induce un cambio conformacional en el complejo de la troponina lo que produce el cese de la actividad inhibitoria, permitiendo la contracción. Las mutaciones en este gen dan lugar a una hipertrofia ventricular que, en algunos casos, está restringida al ápice [148].

La proteína codificada por TNNI3 consta de 210 residuos aminoácídicos codificados por los ocho exones que lo conforman.

El gen **TNNC1** codifica la troponina C que se une al Ca^{2+} e impide la acción inhibitoria de la troponina I, con lo que se puede producir la interacción de la actina y la miosina y la hidrólisis del ATP. Se han descrito mutaciones en este gen implicados en el desarrollo de ciertas formas de MCD.

El gen TNNC1 codifica una proteína de 161 aminoácidos. El gen consta de seis exones.

TPM1 (Gene Bank: AB209041)

El gen TPM1 codifica la α -Tropomiosina. La tropomiosina está situada en el surco de la hélice de actina, o cercano a éste y unidas a ella se encuentra el complejo de troponinas. Está formada por dos cadenas α -hélice y proporciona estabilidad a los filamentos. El gen TPM1, localizado en el cromosoma 15 (15q22.1) es miembro de la familia altamente conservada de tropomiosinas, codifica la cadena α -hélice que, asociada al complejo de troponinas, regulan la interacción dependiente de Ca^{2+} de la actina y la miosina durante la contracción. Aunque se han descrito mutaciones asociadas con MCH en la alfa tropomiosina, éstas son una causa infrecuente de la patología. Alguna mutación descrita en este gen se ha asociado con MCD.

TPM1 da lugar a siete isoformas. Consta de 10 exones que dan lugar a los 284 residuos aminoácídicos que componen la proteína.

ACTC (Gene Bank: BC009978)

ACTC codifica la α actina cardíaca. Las actinas son proteínas altamente conservadas, implicadas en la movilidad de diversos tipos celulares. En las células musculares la actina es el cons-

tituyente principal del filamento delgado. La α -actina cardíaca fue aislada y caracterizada por Hamada y colaboradores en 1982 [150]. Las actinas están involucradas en la generación de fuerza en el sarcómero y en la transmisión de ésta del sarcómero al tejido adyacente. Interactúa con el filamento grueso a través de la β -miosina, de otros polipéptidos del filamento delgado como la troponina I y la α -tropomiosina, de las cadenas ligeras y de las proteínas de anclaje como la actinina y la distrofina.

En ACTC se describieron por primera vez mutaciones asociadas tanto con MCH como con MCD [129]. Se ha visto además que mutaciones en el gen ACTC pueden cursar con no compactación del ventrículo izquierdo así como de defectos septales de presentación familiar [72].

El gen ACTC está localizado en el cromosoma 15 (15q11-q14).

En 1998 Olson y colaboradores publican la primera mutación descrita en ACTC. Se trataba de una mutación missense GCC-TCC que origina un cambio Glu-Gly en la posición 363. Esta mutación se asocia con miocardiopatía dilatada. Fue un año más tarde cuando Mogensen y colaboradores publican en Clinical Investigation la primera mutación en ACTC que da lugar a MCH [151]. Se trata de un cambio GCC-TCC que origina una mutación Ala-Ser en el codón 297, cercana al sitio de unión de la miosina y puede afectar a dicha unión.

Desde entonces, se han descrito múltiples mutaciones implicadas, de gran heterogeneidad en los fenotipos que originan.

El gen ACTC codifica la α -Actina cardíaca, compuesta de 377 residuos aminoácidos codificados por siete exones.

TTN (Gene Bank: AK056602)

El gen TTN codifica la proteína gigante de Titina. La titina tiene un peso molecular de 990 KDa, aproximadamente, lo que la convierte en el polipéptido más grande conocido. Se encuentra de manera abundante en el músculo estriado. Sus moléculas están encadenadas y se extienden desde la línea M hasta la Z en el sarcómero y mantiene unidas las fibras en sentido axial con el disco Z, es decir, una única molécula de titina se expande a lo largo de media sarcómera.

La proteína consta de 244 copias tipo inmunoglobulina y de fibronectina III.

Ramírez y colaboradores comparan las secuencias de titina en la región de la banda I en músculos con diferente tensión pasiva e identificaron dos elementos que se correlacionan con la rigidez del tejido. Los autores sugieren que la titina puede actuar como dos resortes en serie y que la expresión diferencial de estos dos resortes proveería una explicación molecular de la diversidad de longitud del sarcómero así como de la tensión en reposo del músculo estriado de los vertebrados [148].

Este gran tamaño ha dificultado su análisis mediante técnicas de biología molecular tradicional. Se han descrito algunas mutaciones en TTN asociadas con MCH, con MCD y con miopatías esqueléticas [129].

Mutaciones en la titina pueden conllevar un defecto en el ensamblaje del filamento grueso

por la interrupción de la interacción de la titina, la miosina y la proteína C de unión a miosina, que a nivel fenotípico puede derivar en una MCH. Se han descrito mutaciones localizadas en diferentes puntos de la molécula, por ejemplo, en el sitio de unión de la α -actinina que se ha visto aumenta la afinidad a la proteína [148].

El gen TTN se localiza en el cromosoma 2 (2q31) y da lugar a cinco isoformas cardíacas de las cuales la isoforma N2-B es la predominante en músculo cardíaco aunque las isoformas novex-1 y 2 también se encuentran en músculo cardíaco y son casi idénticas a N2-B. La isoforma N2B consta de 26926 residuos aminoacídicos.

MYH6 (Gene Bank: D00943)

Como hemos dicho en el apartado correspondiente a la β miosina, la miosina es una proteína hexamérica. El gen MYH6, situado en el cromosoma 14 (14q12), codifica la subunidad α de la cadena pesada de la miosina cardíaca y se localiza aproximadamente a 4 Kb de MYH7. Se trata de la isoforma predominante en el miocardio en etapa embrionaria y aunque, tras el nacimiento la predominante es la β -miosina, la α sigue expresándose y puede llegar a constituir un porcentaje amplio (30%) de las proteínas ventriculares en el adulto [138].

Mutaciones en este gen se han asociado a MCH, MCD y miopatía esquelética así como con defectos en el septo interauricular [152].

MYH6 origina una proteína de 1939 residuos aminoacídicos y se compone de 39 exones.

PRKAG2 (Gene Bank: AF087875)

PRKAG2, localizado en el cromosoma 7 (7q36.1), codifica la Proteín-kinasa activada por AMP. Se trata de una proteína heterotrimérica formada por una subunidad α catalítica, una subunidad β no catalítica y una subunidad γ reguladora no catalítica. Cada una de estas subunidades puede presentar varias formas y son codificadas por genes diferentes. La proteína kinasa dependiente del AMP cíclico funciona como un sensor de la situación energética de la célula que, cuando disminuye la relación entre ATP y ADP, se activa, produciendo un aumento de la glucólisis y una disminución de la síntesis de glucógeno [129]. Mutaciones en este gen se han asociado con el desarrollo de una forma característica de MCH con Síndrome de Wolff-Parkinson White (SWPW) y trastornos de conducción. El término MCH en este tipo de patología es muy discutido ya que se trataría de una enfermedad de depósito en la que se produce un acúmulo de glucógeno, dentro de las glucogenosis, que afecta al sistema de conducción y explica la preexcitación cardíaca [143] [153].

El gen PRKAG2 da lugar a tres isoformas que difieren en tamaño, dos de ellas codificadas en 16 exones y la tercera en 12.

TCAP (Gene Bank: AJ000491)

TCAP, localizado en el cromosoma 17 (17q12), codifica la Telotonina, una proteína de los discos Z. Los discos Z son fundamentales en el anclaje del aparato contráctil así como en la transmisión de la fuerza, en la distensión de la sarcómera y en la tracción mecánica. Se han encontrado mutaciones en proteínas del disco Z que se han asociado con MCD, no-compactación miocárdica y con MCH. Estas mutaciones en proteínas del disco Z (por ejemplo en el gen TCAP o en MYOZ2) son poco frecuentes en pacientes con MCH. Sin embargo, parecen confirmar el papel de

las proteínas del disco Z como moléculas de señalización que regulan la respuesta cardíaca a la hipertrofia [44].

La telotonina se encuentra en músculo cardíaco y en músculo estriado unida a los dominios Z1-Z2 de la titina y actúa como sustrato de la kinasa de la titina y, por tanto, podrían desempeñar un papel importante en el ensamblaje de la sarcómera.

El gen TCAP consta de dos exones que dan lugar a una proteína de 167 residuos aminoácidos.

GLA (Gene Bank: X16889)

Este gen situado en el cromosoma X (Xq22), codifica la α -Galactosidasa. Se trata de una glicoproteína homodimérica con actividad hidrolítica, principalmente de ceramidas y puede catalizar azúcares.

Se han descrito mutaciones en GLA que afectan a la síntesis, al procesado y estabilidad de la enzima y pueden dar lugar al desarrollo de la enfermedad de Fabry. Esta enfermedad cursa con manifestaciones cardíacas frecuentes. Se han descrito estudios en los que se hace hincapié en la necesidad del estudio genético de GLA en pacientes con MCH en que se han descartado mutaciones en genes sarcoméricos, especialmente en mujeres [154].

GLA consta de siete exones y da lugar a una proteína de 429 aminoácidos.

MYO6 (Gene Bank: U90236, AB002387)

El gen MYO6 codifica la miosina VI. Se localiza en el cromosoma 6 (6q13).

La proteína codificada por MYO6, la miosina VI, está implicada en el transporte intracelular de vesículas y orgánulos, especialmente en células del oído interno. Como ejemplo de la relación de este gen con la MCH, se ha descrito una mutación asociada a hipertrofia ventricular y a sordera [155].

MYO6 da lugar a una proteína de 1285 residuos aminoácidos y consta de 35 exones.

MYLK2 (Gene Bank: AF325549)

El gen MYLK2, codifica la Cadena ligera de la Miosina kinasa 2. Se localiza en el cromosoma 20(20q13.31). Davis y colaboradores describen una mutación en este gen en dos individuos con MCH que provocaba una ganancia en función de la proteína [156].

MYLK2 consta de 12 exones y da lugar a una proteína de 596 aminoácidos.

3.1.2. CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO.

La gran diversidad y heterogeneidad fenotípica de la MCH ha sido ampliamente demostrada y podría ser explicada, en gran medida, por la gran diversidad y heterogeneidad genotípica, sumada a la presencia de dobles [51] y más recientemente triples mutaciones [52] en genes sarcoméricos (que han demostrado derivar en fenotipo más severo), así como por la influencia

de genes modificadores. Las triples mutaciones descritas Girolami y colaboradores se detectaron en cuatro individuos de los 488 casos índice de pacientes diagnosticados de MCH que incluye su estudio. Estos cuatro casos comprendían uno con historia personal de muerte súbita recuperada y tres con un elevado riesgo de padecer una muerte súbita. A todos ellos se les implantó un DAI, que produjo dos descargas apropiadas. Tres de los casos presentaban un fenotipo severo en la cuarta década de vida; se optó por un trasplante en uno de ellos y marcapasos en los otros dos. El fenotipo del cuarto de los casos resultó menos severo. Las mutaciones encontradas fueron, en el primero de los casos (mujer de 32 años de edad), en el gen MYH7, otra en MYBPC3 y la tercera en TNNT3. El segundo caso (varón de 46 años de edad), presentaba dos mutaciones en MYH7 y una tercera en E165D. El tercero (mujer de 45 años de edad), presentaba una mutación en MYH7 y dos en MYBPC3 y el cuarto caso (varón de 50 años), presentaba dos mutaciones en MYBPC3 y una tercera en MYH7. Se realizó el estudio genético para identificar portadores de las mutaciones en familiares en cada uno de estos casos y se describió la diferente severidad de los genotipos en cada uno de ellos. Estudios como el de Girolami y colaboradores son fundamentales para establecer correlaciones entre el genotipo y el fenotipo en la MCH [52].

Binder y colaboradores relacionan el porcentaje de mutaciones que encuentran en ocho genes sarcoméricos con el fenotipo de los pacientes que estudian, de modo que afirman que es posible clasificar a los pacientes en subgrupos en los que la posibilidad de detectar mutaciones varía con la morfología del septo. Relacionan además los tipos de morfología del septo con la edad, de modo que encuentran que la morfología sigmoidea, por ejemplo, es más frecuente en pacientes mayores de 50 años. Detectan mutación en el 37% de los casos estudiados (n=382). En menores de 50 años de edad (n=256) no encuentran mutación en el 55% de los casos. En mayores de 50 años (n=126) no encuentran mutación en el 77% de los casos. Encuentran que la posibilidad de detectar mutaciones en estos genes sarcoméricos varía de entre un 8% a un 79% en función de la morfología del septo. [145]. Entre otros estudios, el llevado a cabo por Bos y colaboradores describe correlaciones entre el fenotipo y el genotipo, de nuevo atendiendo principalmente a la morfología del septo detectada por ecocardiografía y la variante genética encontrada. En la tabla 6 y la figura 17 se recogen de forma resumida este trabajo, se adjuntan los resultados de las frecuencias de las mutaciones en los diferentes genes que estudiaron y que el grupo de Bos relaciona con las diferentes morfologías septales [157].

Estos datos invitan a recapacitar sobre si la MCH debe ser tratada como varias enfermedades y sobre la posibilidad de subdividirla en subgrupos. Tal vez con el tiempo y el estudio de las correlaciones entre genotipo y fenotipo de las variantes genéticas que se van describiendo, se considerará que la MCH es en realidad un grupo de diferentes patologías.

La ecocardiografía doppler de tejido a diferencia de la ECO doppler tradicional que mostraba datos de la velocidad del flujo sanguíneo, aporta datos de la velocidad de los tejidos. Esta técnica aplicada al ventrículo izquierdo puede ayudar a la identificación de portadores de una mutación familiar antes del desarrollo de la hipertrofia [44].

Como hemos visto, múltiples patologías pueden dar lugar a un fenotipo similar al de la MCH, hasta el punto de que se estima que entre un 5 y un 10% de los diagnósticos clínicos de MCH probablemente no son MCH y que la hipertrofia no es sino el resultado de una fenocopia de alguna otra patología. El caso mejor estudiado de fenocopias es el de la enfermedad de Fabry que se debe a una deficiencia en la actividad de la α -galactosidasa y cuyo tratamiento y origen genético es muy diferente al de la MCH [44]. Recientemente Havndrup y colaboradores señalan la

necesidad del estudio genético del gen de la α -galactosidasa (GLA) para establecer el diagnóstico de enfermedad de Fabry, especialmente en mujeres [154].

Como ejemplo de la dificultad de establecer la correlación entre fenotipo y genotipo se ha visto que el fenotipo que originan mutaciones en MYBPC3 no se diferencia del que originan mutaciones en MYH7 [157]. Por otro lado, se debe tener en cuenta que los portadores de una misma mutación pueden presentar fenotipos diferentes. Como hemos visto, existen antecedentes de casos de pacientes portadores de dos e incluso tres mutaciones. En estos pacientes se confirma que la patología es más severa. Esto podría explicar el por qué de estas diferencias de expresión fenotípica en pacientes con una misma mutación patogénica. Tal vez pacientes con fenotipo más severo sean portadores, además, de alguna otra variante genética que esté aumentando la malignidad del fenotipo. En el caso de familiares, en aquellos portadores asintomáticos resulta fundamental el seguimiento periódico ya que la enfermedad puede desarrollarse; la detección precoz de la misma es importante para adoptar un tratamiento preventivo.

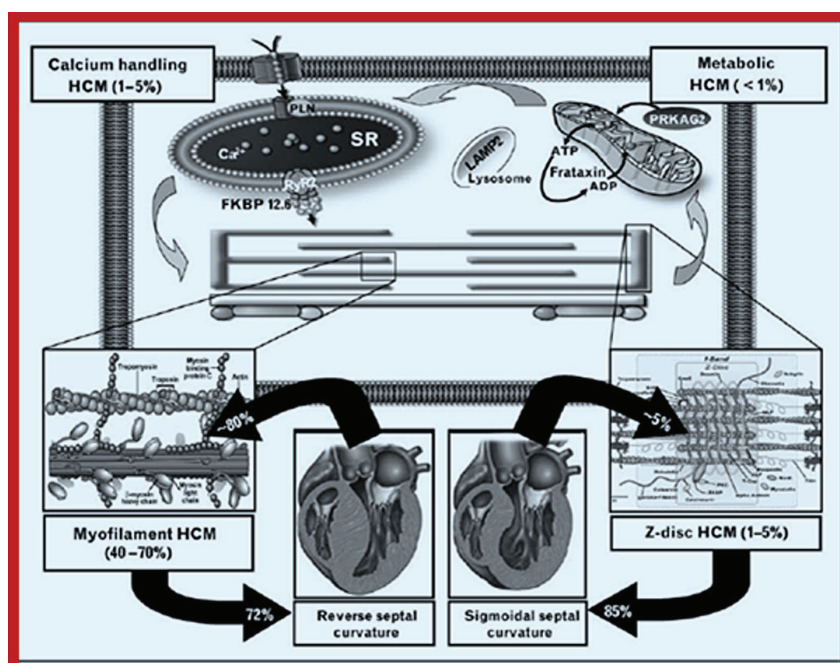


FIGURA 17: Esquema de las diferentes morfologías septales en función del gen implicado en el desarrollo de la patología. | Fuente: Bos, J.M., et al. (2007) [157].

PROTEÍNA CODIFICADA	SÍMBOLO DEL GEN	LOCUS	ESTABLECIDO/PROBABLE ²³	TIPO DE MCH ²³	FRECUENCIA MUTACIONES ²³	FENOTIPOS RELACIONADOS ²³	FRECUENCIA DE FENOTIPO MCH ²³ (%)		
							REVERSA	SIGMOIDAL	APICAL
α -actina cardíaca	ACTC	15q11-q14	Establecido	MCH Sarcomérica (Filamento delgado)	Rara	MCH/MCD/no compactación V.L., defectos septales	<1	0	0
Proteína C de unión a la miosina	MYBPC3	11p11.2	Establecido	MCH Sarcomérica (Filamento intermedio)	~25%	MCH/MCD	30-40	5	10-15
Cadena pesada de la α -miosina	MYH6	14q12	Probable	MCH Sarcomérica (Filamento grueso)	Rara	MCH/MCD/defectos septales; miopatía esquelética	-	-	-
Cadena pesada de la β -miosina	MYH7	14q12	Establecido	MCH Sarcomérica (Filamento grueso)	~25%	MCH/MCD/miopatía esquelética, fibroelastosis endocárdica	30-40	<5	10-15
Cadena ligera reguladora de la miosina	MYL2	12q24.11	Establecido	MCH Sarcomérica (Filamento grueso)	Rara	MCH	<5	0	2-4
Cadena ligera esencial de la miosina	MYL3	3p21.3-p21.2	Establecido	MCH Sarcomérica (Filamento grueso)	Rara	MCH	-	-	-
Troponina C cardíaca	TNNC1	3p21.3-p14.3	Probable	MCH Sarcomérica	Rara	MCH/MCD	X	X	X
Troponina I cardíaca	TNNI3	19q13.4	Establecido	MCH Sarcomérica (Filamento delgado)	~3-5%	MCH/MCD/miocardiopatía a restrictiva	1-2	<1	0
Troponina T Cardíaca	TNNI2	1q32	Establecido	MCH Sarcomérica (Filamento delgado)	~3-5%	MCH/MCD	5-10	<1	<5
α -tropomiosina	TPM1	15q22.1	Establecido	MCH Sarcomérica (Filamento delgado)	~1%	MCH/MCD	1-2	0	0
α -actinina	ACTN2	14q2-4q3	-	MCH disco-Z	-		0	1	0
Proteína LIM	CSRP3	11p15.1	-	MCH disco-Z	-	MCH/MCD	0	<1	0

TABLA 6. Continúa en página siguiente.

PROTEÍNA CODIFICADA	SÍMBOLO DEL GEN	LOCUS	ESTABLECIDO/PROBABLE ^{*1}	TIPO DE MCH ^{*2}	FRECUENCIA MUTACIONES ^{*3}	FENOTIPOS RELACIONADOS ^{*4}	FRECUENCIA DE FENOTIPO MCH ^{*4} (%)	
							REVERSA	SIGMOIDAL APICAL
Proteína 3 de unión al dominio LIM	LDB3	10q22.3-q23.2	-	MCH disco-Z	-		0	3
Miocenina – 2	MYOZ2	4q26-q27	Establecido	MCH disco-Z	1 : 250	MCH	X	X
Telotonina	TCAP	17q12	Establecido	MCH disco-Z	Rara	MCH/MCD/no compactación V.I	0	<1
Vinculina	VCL	10q22.2	-	MCH disco-Z	-	MCH/MCD	0	<1
Junctofilina 2	fPH2	20q13.12	-	MCH Intercambio de Ca ²⁺	-		<1	<1
Fosfolamban	PLN	6q22.1	Probable	MCH Intercambio de Ca ²⁺	Rara	MCH/MCD	-	-
Frataxina	FXN	9q13-q21.1	-	MCH Metabólico	-		-	-
α-galactosidasa	GLA	Xq22	-	MCH Metabólico	-		-	-
Proteína 2 Asociada a membrana lisosomal	LAMP2	Xq24	-	MCH Metabólico	-	Enfermedad de Danon Depósito lisosomal de glucógeno	-	-
Subunidad γ de la protein - cinasa dependiente de AMP _c	PRKAG2	7q36.1	-	MCH Metabólico	-	hipertrofia/trastornos de la conducción, WPW (Wolf Parkinson White glucogenosis)	-	-
RAF Serin-treonin cinasa	RAF1	3p25	-	MCH Metabólico	-		X	X
Titina	TTN	2q31	Establecido	MCH Sarcomérica (Filamento gigante)	Rara	MCH/MCD/miopatía esquelética	-	-
Cadena ligera reguladora de miosina quínasa	MYLK2	20q13.31	Probable	-	-		X	X
Caveolina 3	CAV 3	3p25	Probable	MCH disco-Z	Rara		X	X
Miosina 6	MYO6	6q13	-	-	-			

TABLA 6: Principales genes implicados en MCH: prevalencia y correlación genotipo-fenotipo | ^{*1}: clasificación establecido/ probable según Marian, A.J., et al.(2010) [44]. ^{*2}: fuente Tester, D. J., Askerman, M.J. (2009) [158]; Bos, J.M., et al. (2007) [157] y datos NCBI ^{*3}: V Monserrat-Dumont (2007) [129]. ^{*4}: Fuente Bos, J.M., et al. (2007) [157]; Frecuencia estimada/ aproximada de las mutaciones según el subgrupo morfológico (morfología del septo): MCH conCurva reversa, MCH Sigmoideal y MCH Apical. MCH: Miocardiopatía hipertrofica; -. No hay estudios genotipo- fenotipo de grandes cohortes de pacientes relacionados, así que no se puede estimar la frecuencia; X: Gen no considerado en Bos et al. ^{*5}: Fuente Marian, A.J., (2010) [44]; Rodríguez – Calvo, M.S. et al. (2008), [159].

3.1.3. **ESTUDIO GENÉTICO.**

En el estudio de las causas genéticas de la MSC, se han utilizado estrategias diferentes. El estudio genético en genes candidatos por secuenciación directa trata de establecer la relación entre el riesgo a sufrir una MSC con las variaciones genéticas detectadas en genes seleccionados de rutas metabólicas concretas. Aunque estos estudios nos permiten evaluar variantes genéticas que pueden conferir riesgo (o protección) a la MSC, se trata de una estrategia de análisis de genes conocidos y por tanto limitada a éstos. Sin embargo, sabemos que la MCH puede ser consecuencia de múltiples factores e interacciones entre diferentes genes. La lista de genes y de variantes genéticas es creciente, de modo que el estudio de genomas completos podría ser una estrategia adecuada para identificar regiones del genoma en las que se puedan encontrar nuevas variantes genéticas. Varios estudios, entre el que encontramos el de Girolami y colaboradores, secuencian los genes implicados en el desarrollo de MCH mediante resecuenciación de genes implicados. Girolami y colaboradores estudian los exones y las regiones de *splicing* de MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3, TPM1, ACTC, MYL2, MYL3, LAMP2, PRKAG2 y GLA por medio de un *array* a medida que diseñan en la plataforma Affymetrix (*Affymetrix, Santa Clara, California*) [52]. Se han desarrollado estudios similares de resecuenciación de genes implicados en MCH [160] [161]. El principal problema que presentan la resecuenciación a gran escala o las nuevas aproximaciones de secuenciación de última generación (NGS: *Next Generation Sequencing*) es el análisis de los datos que necesita el desarrollo de herramientas bioinformáticas potentes.

La estrategia de detección o análisis directo de variantes descritas es de gran utilidad ya que, gracias a las nuevas tecnologías, permite un análisis rápido de dichas variantes. La rapidez de esta estrategia la convierte en la herramienta más eficaz a la hora de establecer un análisis genético rápido y de aplicabilidad casi inmediata. Permite que los grupos de consejo genético de los centros hospitalarios puedan tener los datos del análisis genético de forma rápida para evaluarlos junto a los datos clínicos y así prestar asesoramiento genético a pacientes y familiares. Se debe tener presente que, en este momento, la detección de una mutación específica no es suficiente para poder guiar la terapia, sino que aporta un dato a tener en cuenta a la hora de evaluar cada caso de forma individual, junto a la historia familiar y clínica del portador.

En el año 2010 Chiu y colaboradores publican los resultados de un estudio GWAS en pacientes de MCH. Tras excluir mutaciones en genes que codifican proteínas sarcoméricas encuentran como genes candidatos el receptor de rianodina (Ryr2) y la actinina 2 (ACTN2). Encuentran mutaciones en ACTN2, un componente importante del disco Z, que ancla y entrecruza los filamentos de actina. Las variantes encontradas son consideradas mutaciones causales. Los pacientes sufrían una hipertrofia media con una distribución que afectaba sobre todo al septo, aunque también apical o concéntrico en algunos individuos, e incluso en el ventrículo derecho en otros [162].

Hersberger y colaboradores publican en 2009 unas recomendaciones de la HFSA (*Heart Failure Society of America*) para la evaluación genética en las diferentes miocardiopatías (refiriéndose a éstas como las cardiopatías con base genética clara). La información detallada de la historia familiar es considerada relevante en las miocardiopatías. Se considera de gran valor para la identificación de individuos que pudiesen estar en riesgo. Debido a que, en general, la penetrancia de estas patologías es baja, se considera necesario el estudio de, al menos, tres generaciones para determinar que se trata de una miocardiopatía hereditaria así como para definir el patrón de herencia autosómico o recesivo. Se debe solicitar información al paciente o a sus familiares sobre

la historia clínica familiar. En el caso concreto de la MCH, se debe solicitar información relativa a la MSC en adolescentes y adultos jóvenes en la familia e incluso diseñar un árbol que refleje datos de la historia clínica familiar que ayudará a esclarecer, una vez confirmada la naturaleza hereditaria de la patología, el modo de herencia de la misma. Debe considerarse herencia bi-lineal, es decir, la transmisión de la mutación causal de la patología, tanto por herencia materna como paterna y no asumir a priori la vertiente familiar de origen. Esto cobra especial relevancia teniendo en cuenta la diferencia en la severidad del fenotipo en pacientes con dobles y triples mutaciones. El conocimiento de la historia familiar puede darnos idea, por ejemplo, de la edad en que se desarrolla la patología, de su letalidad o de la respuesta a un tratamiento. La recogida e interpretación de estos datos es laboriosa para la práctica clínica, de forma que se recomienda que se remita a los pacientes con miocardiopatía a centros especializados en genética de miocardiopatías. Hersberger y su equipo recomiendan, así mismo, el estudio clínico de miocardiopatías en familiares asintomáticos de primer orden y describen los intervalos de tiempo con que se debería realizar el seguimiento. Por último, proponen que el estudio genético debe realizarse en el familiar en que la afección sea más clara para facilitar el manejo y el estudio de los demás familiares [163].

Estas recomendaciones deben actualizarse con cierta periodicidad debido a que el conocimiento de las bases genéticas de las miocardiopatías avanza de forma rápida.

3.1.4. **CONSEJO GENÉTICO.**

Pese a que los avances en el entendimiento de la genética de la MCH son rápidos, cada vez menos costosos en tiempo y más asequibles, el consejo genético resulta todavía muy complicado de establecer debido a la gran heterogeneidad de la MCH, lo que dificulta la estratificación del riesgo de portadores de mutaciones implicadas en esta patología. El trabajo conjunto de especialistas, clínicos, farmacéuticos y genetistas es fundamental para decidir el tratamiento más adecuado de estos pacientes. El seguimiento de los mismos de manera continuada ayudará a establecer las correlaciones genotipo-fenotipo con exactitud, de tal modo que la individualización del tratamiento y el diagnóstico molecular de la MCH será una realidad a corto plazo. Es necesaria la creación de bases de datos públicas que ayuden a comprender un caso en concreto, por haber sido descrito algún otro similar previamente.

Los portadores presintomáticos deben someterse, con frecuencia, a exámenes cardiológicos exhaustivos a fin de identificar los primeros signos de la patología. Afectos, portadores y familiares deben ser informados de los posibles riesgos y síntomas, de modo que puedan identificarlos. En el caso de pacientes presintomáticos, es importante la prevención, no sólo con exámenes clínicos de rutina sino también para la valoración de la terapia farmacológica más adecuada o estimar, en su caso, la implantación de un DAI [163].

Las estrategias de estudio genético a gran escala así como la secuenciación directa de genes seleccionados dan lugar a multitud de datos. La interpretación de estos datos supone un problema a la hora de prestar asesoramiento genético ya que se detectan variantes genéticas con implicaciones funcionales desconocidas. Los programas de simulación informática del efecto que la variante ejerce sobre la proteína, como el PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) son una herramienta útil ya que los estudios funcionales en modelos animales son inabarcables en un número tan elevado de variables genéticas.

3.2. SÍNDROME DE QT LARGO.

Se han descrito numerosas mutaciones en genes que codifican las diferentes subunidades de los canales iónicos reguladores del intercambio de iones a través de la membrana celular. Estos genes, 12 hasta el momento, así como su frecuencia en casos de SQTl, pueden verse en la tabla 7. En la figura 18 se representan, de forma esquemática, los principales genes en los que se han descrito variantes genéticas implicadas en las diferentes canalopatías.

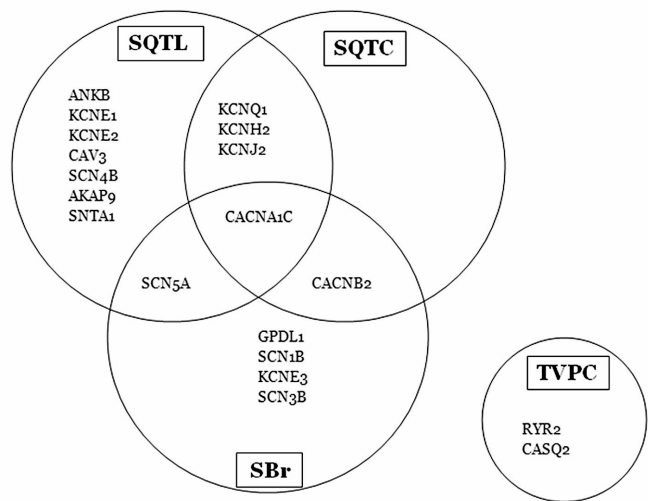


FIGURA 18: Heterogeneidad genética y solapamiento entre los principales genes implicados en el desarrollo de desórdenes arritmogénicos.

3.2.1. EPIDEMIOLOGÍA GENÉTICA.

Alguno de los genes relacionados con el SQTl son comunes a SBr, SQTc y al SMSL (Tabla 7); es decir, mutaciones en los mismos genes pueden dar lugar a arritmias familiares diferentes (y a defectos de conducción como ocurre en el caso de SCN5A). Las mutaciones en los canales de K⁺ provocan defectos en la apertura de los canales lo cual conlleva un descenso de la salida de K⁺ de la célula. Las mutaciones en los canales de Na⁺ provocan un fallo en el cierre de éstos y una entrada excesiva del catión al interior celular. El resultado es un gradiente eléctrico inadecuado durante el potencial de acción que conlleva una prolongación del intervalo QT.

De nuevo se profundizará en aquellos genes incluidos en el estudio genético que hemos desarrollado:

KCNQ1 (Gene Bank: AF000571)

El gen KCNQ1 se localiza en el cromosoma 11 (11p15.5). Codifica una proteína del canal de K⁺ dependiente de voltaje, la proteína Kv7.1, fundamental en la fase de repolarización del potencial de acción. Esta proteína se une a otras proteínas del canal de K⁺ que son codificadas por los

genes KCNE1 y KCNE3 y forman complejos multiméricos heterogéneos que originan la corriente lenta de $K^+ I_{ks}$.

Como se ve en la tabla 7, mutaciones en este gen dan lugar a dos síndromes diferentes; Así, mutaciones en heterozigosis en este gen dan lugar al síndrome Romano Ward, mutaciones en homozigosis o heterozigotos compuestos dan lugar al síndrome de Jervell Lange-Nielsen. Se han descrito mutaciones en KCNQ1 que dan lugar a fibrilación atrial familiar. El síndrome de QT largo tipo 1 se debe a mutaciones en este gen. La expresión de este gen es fundamentalmente cardíaca.

KCNQ1 da lugar a dos isoformas. De éstas, la isoforma 1 es la predominante que difiere de la isoforma 2 en que la proteína resultante tiene un N-t más corto. Es un gen formado por 16 exones que dan lugar a una proteína de 676 residuos aminoácidos.

KCNH2 (Gene Bank: U04270)

También denominado HERG debido a la similitud con la secuencia del gen *ether a-go-go* de *Drosophila*, se localiza en el cromosoma 7 (7q35-q36). Este gen fue aislado en 1994 del hipo-campo. La proteína que codifica, Kv11.1, forma seis segmentos transmembrana. Ésta es responsable de la activación rápida del I_{kr} . Mutaciones en este gen dan lugar al Síndrome de QT Largo tipo 2 (LQT2).

El gen KCNH2 da lugar a tres isoformas de las cuales la isoforma c también llamada HERG1b es más corta. Las isoformas a y c están formadas por 1159 y 819 residuos aminoácidos respectivamente codificados en 15 y 11 exones mientras que la isoforma b consta de nueve exones y da lugar a 888 aminoácidos.

SCN5A (Gene Bank: AJ310893)

Este gen, denominado gen de la subunidad α del canal de Na^+ dependiente de voltaje tipo V, codifica la subunidad α del canal de Na^+ cardíaco, NaV1.5. Se localiza en el cromosoma 3 (3p21). Defectos en este gen pueden cursar con inactivación retrasada del canal de Na^+ así como con reaperturas indebidas del mismo que originan corrientes hacia el interior de la célula las cuales prolongan el potencial de acción y por tanto el intervalo QT. Mutaciones en este gen dan lugar al síndrome de QT Largo tipo 3 (QTL3) por ganancia de función de los canales. Como vimos, en el SBr se han descrito mutaciones en este mismo gen que conllevan la pérdida de función de este canal.

SCN5A da lugar a cuatro isoformas, que varían en su tamaño. El número de exones que codifican la proteína es y 27 una de las isoformas y 28 en tres de ellas.

PROTEÍNA CODIFICADA	SÍMBOLO DEL GEN	LOCUS	MECANISMOS ASOCIADOS ^{*1}	TIPO DE SQT ^{*2}	FRECUENCIA MUTACIONES ^{*3}	FENOTIPOS RELACIONADOS ^{*3} (SÍNDROME)	DESENCADENANTES ^{*4}
Proteína Kv7.1	KCNQ1	11p15.5	PÉRDIDA DE FUNCIÓN	QTL 1	30-35%	SRW, SILN, FA	Arritmia provocada por ejercicio, natación y emociones.
Proteína Kv11.1	KCNH2	7q35-q36	PÉRDIDA DE FUNCIÓN	QTL 2	25-30%	SRW	Arritmia provocada por sonidos o emociones.
Proteína Nav1.5	SCN5A	3p21	GANANCIA DE FUNCIÓN/ PÉRDIDA EN SBr	QTL 3	5-10% para LQT3 20-30% para SBr	SRW, SBr1, S Lev- Lenegre, FA	Arritmia provocada durante el sueño descanso y emociones.
Anquirina 2	ANK2	4q25-q27	PÉRDIDA DE FUNCIÓN	QTL 4	Rara (<1)	SRW	Arritmia provocada durante el ejercicio.
Mink	KCNE1	21q22.1	PÉRDIDA DE FUNCIÓN	QTL 5	Rara (<1)	SRW, SILN	Arritmia provocada durante el ejercicio y emociones.
MIRP1	KCNE2	21q22.1	PÉRDIDA DE FUNCIÓN	QTL 6	Rara (<1)	SRW, FA	Arritmia provocada durante el descanso y ejercicio.
Kir2.1	KCNJ2	17q23	PÉRDIDA DE FUNCIÓN	QTL 7	Rara (<1)	SA, FA	Sindrómico, Arritmia provocada durante el descanso y ejercicio, frecuente ectopia ventricular.
Canal de calcio tipo L	CACNA1C	12p13.3	GANANCIA DE FUNCIÓN/ PÉRDIDA EN SBr3	QTL 8	Rara (<1)	ST, SBr3	Sindrómico, desarrollo rápido y muerte por arritmias.
Caveolina-3	CAV3	3p25	PÉRDIDA DE FUNCIÓN	QTL 9	Rara (<1)	SRW	Arritmia provocada durante el descanso y sueño.
Canal de Sodio β4	SCN4B	11q23.3	PÉRDIDA DE FUNCIÓN	QTL 10	Rara (<0,1)	SRW	Arritmia provocada durante el ejercicio.
Yotiao	AKAP9	7q21-q22	PÉRDIDA DE FUNCIÓN	QTL 11	Rara (<0,1)	SRW	Arritmia provocada durante el ejercicio.
Sinotrofina- α1	SNTA1	20q11.2	PÉRDIDA DE FUNCIÓN	QTL 12	Rara (<0,1)	SRW	Arritmia provocada durante el descanso.

TABLA 7: GENES IMPLICADOS EN SQT. | *1: Fuente: Hedley et al. (2009) [81] *2: Fuente: Hedley et al. (2009) [81] y NCBI *3: Fuente: Hedley et al. (2009) [81]; HURST S 12th Edición THE HEART (2008) [86] SRW: Síndrome de Romano- Ward. SILN: Síndrome de Jervell and Lange- Nielsen. SA: Síndrome de Andersen. ST: Síndrome de Timothy. SBr(1, 3): Síndrome de Brugada (tipos 1, 3). S Lev – Lenegre: Síndrome de Lev Lenegre. FA: Fibrilación Atrial Familiar. *4: Desencadenantes típicos de arritmia, y *5 Fuente Hedley et al. (2009) [81]

3.2.2. **CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO.**

Se han descrito asociaciones claras entre el gen mutado, el subtipo de SQT y el desencadenante de la arritmia. Schwartz y colaboradores determinan que en un 97% de los pacientes con LQT1 los eventos cardíacos tienen lugar durante actividad física[164]. Se ha visto que la natación es un desencadenante frecuente de eventos cardíacos en pacientes con LQT1 [165] [166]. El grupo de Schwartz afirma además que los desencadenantes típicos de eventos cardíacos en pacientes con LQT2 son estímulos auditivos y el momento de despertarse mientras que en los pacientes de LQT3 los eventos tienen lugar en reposo.

Las correlaciones genotipo-fenotipo en el SQT son complicadas de establecer debido a la heterogeneidad intra alélica. Sin embargo, en el caso de LQT1, LQT2 y LQT3 ha sido posible establecer la correlación entre el genotipo y el pronóstico de la enfermedad en algunos casos tales como la respuesta a β -bloqueantes adrenérgicos, la predisposición a eventos cardíacos o muerte así como la morfología del ECG.

Los estudios de Schwartz y colaboradores en 2001, Zareba y colaboradores en 1998 y el de Priori y colaboradores en 2003 evalúan el riesgo de eventos cardíacos en función del genotipo. El estudio de Priori y colaboradores incluye 647 pacientes con SQT de 193 familias en el que se vio que el riesgo de padecer eventos cardíacos era considerablemente menor en pacientes con LQT1 que en pacientes con LQT2 y 3. Más del 30% de los portadores de mutación con síndrome de LQT1 eran asintomáticos [167].

Todavía no es posible utilizar únicamente la información genética para la estratificación del riesgo ya que la comprensión de los posibles factores modificadores está todavía en etapas tempranas.

Numerosos estudios tratan de establecer la relación genotipo-fenotipo en el SQT a fin de llegar a conocer las bases genéticas de esta enfermedad que puedan determinar las arritmias fatales, los diversos fenotipos electrocardiográficos y la respuesta a la terapia. Los genes más estudiados son los responsables de LQT1, LQT2 y LQT3. Se ha encontrado significado pronóstico para mutaciones en los tres genes. En general, pacientes con LQT1 y LQT2 presentan un mayor riesgo de eventos cardíacos que pacientes afectados de LQT3, aunque éste parece estar relacionado con una mayor mortalidad. Los pacientes de LQT2 y LQT3 presentan un pronóstico peor a largo plazo que los afectados de LQT1 en los que, según Priori y colaboradores, el 30% de los portadores de mutaciones son asintomáticos [167]. El mismo valor de QT corregido (QTc) conlleva un peor pronóstico en pacientes con LQT2 y LQT3 que los pacientes afectados de LQT1 con ese mismo valor de QTc. Como hemos visto, las variables más importantes a tener en cuenta son el sexo y la duración del intervalo QT. El riesgo de sufrir síntomas antes de los 40 años de edad es mayor en mujeres afectas de LQT2 y en hombres afectados de LQT3 [167].

En cuanto a la terapia, los pacientes de LQT1 responden a la terapia con β -bloqueantes mientras que, en general, los pacientes de LQT3 no responden al mismo.

El establecimiento de la correlación genotipo-fenotipo supone un reto debido a que portadores de una misma mutación con frecuencia presentan fenotipos diferentes, a causa, tal vez, de

que no están de todo esclarecidos los factores epigenéticos que pueden estar interactuando. La localización de la mutación en la molécula determina el riesgo de sufrir síntomas cardíacos. Se han descrito polimorfismos implicados en variaciones en la duración del intervalo, que pueden dar lugar, tanto a defectos en la conducción como a defectos en la repolarización, de modo que estos polimorfismos pueden actuar como modificadores de la enfermedad [81].

Los datos sobre los demás genes implicados en el desarrollo del resto de los tipos de QT largo son aún limitados. Sin embargo, los pacientes que sufren síndrome de Jervell- Lange Nielsen y pacientes con síndrome de Timothy (LQT8) parecen presentar un mayor riesgo de MSC asociado y tienen un riesgo mayor de sufrir una MSC desde la infancia [81].

3.2.3. **ESTUDIO GENÉTICO.**

El estudio genético del SQTl permite identificar portadores, asintomáticos o no, así como identificar los individuos que no son portadores de la mutación detectada en el caso índice de la familia. Los portadores asintomáticos son pacientes en riesgo de MSC; el problema, de nuevo, es la estratificación de este riesgo.

El estudio genético de personas que fallecen de manera repentina y en los que tras rigurosa autopsia no se encuentra la causa de la muerte es fundamental para conocer la posible causa del fallecimiento así como para el estudio genético de familiares que podrían estar en riesgo de sufrir un evento cardíaco fatal. El conocimiento de las correlaciones entre el genotipo y el fenotipo permitirá que se puedan adoptar medidas preventivas en estos pacientes.

En neonatos, la identificación de variantes genéticas es importante ya que el diagnóstico por procedimientos clínicos tradicionales como el ECG, es complicado en este grupo de población. Como veremos en el apartado correspondiente al SMSL, los genes causales de estas canalopatías pueden dar lugar a la muerte súbita en neonatos.

Al igual que en el caso de la MCH, el estudio genético habitual consiste en la detección directa de mutaciones en genes candidatos. Pese a que en el caso de SQTl los genes implicados, al menos en este momento, son menos numerosos, cabe esperar que se vayan describiendo nuevas variantes genéticas, genes e interacciones; de nuevo los estudios de genoma completo son una estrategia firme para tratar de identificar dichas variantes. La detección de mutaciones descritas permite un estudio genético rápido de los casos y aportan datos para proceder a la terapia más indicada en función de la historia clínica y familiar de cada paciente. Debe prestarse especial atención a los pacientes presintomáticos. La identificación de los portadores de mutaciones mediante el estudio genético de familiares en que no se detecta expresión fenotípica de la enfermedad permitirá la identificación de individuos en situación de riesgo y facilitará el seguimiento de los mismos a fin de detectar la patología en etapas tempranas de su desarrollo. Es necesario que los portadores conozcan esta predisposición con el fin de que presten especial atención a síntomas que puedan ser indicadores del desarrollo de la patología. En caso de familiares afectados de SBr portadores de la mutación pese a ser asintomáticos, se podría estudiar si la arritmia puede ser inducida (demostrable con *test* realizado con Flecainida, Procainamida o Ajmalina).

El diagnóstico de la patología mediante el valor QTc calculado a partir del ECG es difícil de establecer por lo que el estudio genético ayuda a diagnosticar esta patología de manera más precisa. Las correlaciones genotipo-fenotipo en el SQTl muestran que un valor del intervalo QT

corregido por el ritmo cardíaco (QTc) no excluye del SQTl por lo que el estudio genético debe ser realizado para confirmar o excluir mutaciones en pacientes y familiares con un SQTl confirmado o con sospechas del mismo. El estudio genético se puede llevar a cabo si hay una sospecha del SQTl que lo justifique, tales como el síncope inexplicado, historia familiar de MSC, arritmia ventricular inexplicada o la detección electrocardiográfica de un intervalo QT prolongado. El criterio de Schwartz no incluye los estudios genéticos pero son fundamentales para la identificación de portadores asintomáticos [81] [93].

Introducir los estudios genéticos en la praxis médica habitual entre deportistas de élite es objeto de debate. En este grupo poblacional, el análisis genético no sólo de canalopatías sino también de miocardiopatías, podría justificarse en aquellos individuos considerados en situación de riesgo de sufrir un evento cardíaco fatal, es decir, en los deportistas con historia familiar de muerte súbita cardíaca, síncope inexplicado o historia clínica sospechosa de alguna de estas patologías.

3.2.4. CONSEJO GENÉTICO.

Las medidas terapéuticas son muy complicadas de tomar, especialmente en portadores asintomáticos. De nuevo se hace patente la necesidad de la creación de equipos multidisciplinarios que puedan ofrecer consejo genético a familiares así como el intercambio de experiencias en cada área de conocimiento y en los casos concretos que ayuden a personalizar el tratamiento de estos pacientes.

El avance en el conocimiento de las correlaciones entre el genotipo y el fenotipo permitirá prestar asesoramiento genético a pacientes y familiares.

Es necesaria la creación de unas recomendaciones estandarizadas para la comunidad científica que definan las indicaciones más adecuadas tanto para el manejo clínico de afectos del SQTl y sus familiares como para su estudio, por parte de especialistas en genética, del SQTl y SBr.

3.3. SÍNDROME DE LA MUERTE SÚBITA DEL LACTANTE.

3.3.1. EPIDEMIOLOGÍA GENÉTICA.

Maron y colaboradores proponen, en 1976, el SQTl como una de las causas del SMSL [168]. Schwartz y colaboradores publican los resultados de un estudio que incluye más de 34000 neonatos a los que se les realiza un ECG al tercer o cuarto día del nacimiento. Concluyen que el 50% de los recién nacidos que fallecen víctimas del SMSL, presentaban un intervalo QT prolongado mayor de 440 ms con un factor de riesgo elevado comparado con el valor del *odd ratio* de factores ambientales que se habían estudiado hasta el momento [169]. Estos hallazgos les llevan a publicar en el año 2000 un caso con una mutación en SCN5A. Se ha visto que en torno al 2% de los casos de muerte súbita del lactante estudiados presentan mutaciones en este gen [170]. En 2005 se publica un caso que relaciona la patología con el SBr [171]. El equipo de Arnestad encuentra mutaciones asociadas a los síndromes de QTL, desde LQT1 hasta LQT6, en más de un 9.5% de los casos estudiados [172].

Se han descrito mutaciones en casos de SMSL en CAV3, también asociado al desarrollo de SQT [173]. Como hemos visto, se han descrito 12 genes implicados en el SQT, por lo que es conveniente el estudio genético de estos mismo genes en el SMSL. Otros estudios han encontrado mutaciones en el gen *Ryr2*, gen asociado al desarrollo de TVPC [119] [174]. Son muchos los genes que están siendo estudiados como candidatos en el SMSL. En 2007 Van Norstrand y colaboradores describen mutaciones en *GPD1L* en dos neonatos de raza blanca [175].

Los estudios en el gen del transportador de la serotonina 5-HTT localizado en el cromosoma 17 (17q11.1-q12) han encontrado una asociación significativa con el desarrollo del SMSL. Los estudios partieron de las médulas espinales de neonatos en los que se estudiaron defectos neuronales asociados a alteraciones en el acoplamiento de la serotonina con los receptores 5-HT_{1A}. Estas neuronas del bulbo raquídeo que producen serotonina (neuronas serotonérgicas) proyectan sus fibras nerviosas a núcleos autónomos y respiratorios del tronco cerebral y de la médula espinal; contribuyen, además, a la homeostasis y activación de la función respiratoria, regulación de la presión arterial, termorregulación y reflejos de la vía aérea superior y al despertar del individuo. Se ha visto que en el SMSL los elementos básicos de la neurotransmisión están alterados, por lo que la muerte podría ser debida a un fallo respiratorio y a otras respuestas del sistema nervioso autónomo ante factores estresantes durante el sueño. Se ha visto que el número de neuronas serotonérgicas es elevado en casos de SMSL tal vez debido a la inmadurez morfológica del bebé lo que sugiere que anomalías en el desarrollo del recién nacido puedan ser el origen de defectos en el sistema neurotransmisor de la serotonina. Se han descrito polimorfismos en la región promotora de este gen que afectan a la captación de serotonina y parecen estar implicados en el SMSL.

Se han llevado a cabo numerosos estudios genéticos que tratan de buscar las causas genéticas del SMSL. Estos estudios incluyen genes implicados en la diferenciación y desarrollo del sistema nervioso central (*BMP2*, *MASH1*, *PHOX2A*, *RET*, *ECE1*, *EDN1*, *TLX3*, *EN1* o *PHOX2B*) y genes que codifican enzimas metabolizadoras de nicotina que parecen estar implicados en el bajo peso del recién nacido. Los polimorfismos encontrados aún no han sido validados en el SMSL (no se diferenciaban de controles en diferentes grupos étnicos). Se estudian, además, genes que codifican proteínas implicadas en procesos infecciosos o inflamatorios. Un ejemplo es el del complejo mayor de histocompatibilidad (*HLA-DR2*). Se han estudiado genes implicados en la producción de energía, la hipoglucemia y la regulación térmica (estudios de mutaciones en el ADN mitocondrial bajo la premisa de la baja actividad de los recién nacidos que duermen largos periodos de tiempo).

El SMSL se asocia al bajo peso del bebé en el nacimiento y a un retraso en el crecimiento intrauterino lo que ha dado pie a la búsqueda de variantes genéticas en genes que codifican proteínas implicadas en la regulación de la hipoglucemia o la cantidad de glucosa en sangre, tales como la glucocinasa (*GCK*) y la glucosa 6- fosfatasa (*G6PC*).

El estudio de genes que codifican proteínas sarcoméricas empieza a ser de interés en la muerte súbita del lactante y en niños; se desarrollan numerosos estudios para tratar de esclarecer la implicación de estos genes, que hasta el momento se habían relacionado con MCH y muerte súbita en el adulto [176] [177] [178] [179]. Se parte de la premisa de que estos genes pueden dar lugar a mutaciones que cursan con un fenotipo muy leve o indetectable incluso tras la autopsia, y son, sin embargo, letales y causa importante de muerte en población joven. Bajo esa hipótesis nos planteamos nuestro estudio genético a partir de muestras de tejido de neonatos que fallecen víctimas del SMSL. Los genes sarcoméricos y no sarcoméricos que hemos estudiado en estas muestras fueron explicados en el apartado de epidemiología genética de la MCH.

Es necesario indagar en las causas genéticas del SMSL antes de poder establecer correlaciones entre el genotipo y el fenotipo en esta entidad. Estudios de genomas completos podrían mostrar regiones concretas de interés para profundizar en los genes implicados en el desarrollo del síndrome. En el caso del SMSL el conocimiento de las bases genéticas implicadas por el momento es muy reducido y todavía no podemos hablar de correlaciones genotipo-fenotipo claras. Se han descrito porcentajes variables de mutaciones asociadas al SQTl en pacientes con muerte súbita y autopsia negativa. Éstos oscilan desde aproximadamente el 10% en muerte súbita infantil y el 35% en el adulto joven. En vista de estos resultados se ha propuesto la realización de un ECG sistemático en todos los neonatos [180].

Weese-Mayer y colaboradores publican, en 2007, una revisión de los factores genéticos implicados en el SMSL. Recogen datos de estudios realizados por diferentes grupos y resumen las frecuencia de mutaciones en genes implicados en el SQTl y en la TVPC tipo I. Entre los genes implicados en el SQTl, se ve que el mayor porcentaje de mutaciones en casos de SMSL se encuentra, fundamentalmente, en los genes *KCNQ1* y *KCNH2* (con una frecuencia en torno al 1% en ambos) y en *SCN5A*, que resultó ser el gen en que se describió un mayor número de casos con mutaciones (frecuencia entre el 5-10% en niños caucasoides). La *CAV3* representaba en torno al 5% de frecuencia en neonatos de raza negra y en *Ryr2* encuentran una frecuencia en torno al 2%.

El grupo de Weese-Mayer recogen, además, datos publicados sobre polimorfismos en 5-HTT de estudios en diferentes grupos poblacionales: japoneses, afroamericanos y caucasoides americanos.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En el desarrollo de la MSC están implicadas un amplio número de patologías que caracterizadas por presentar una gran heterogeneidad fenotípica y genotípica. Supone un grave problema de salud que, en un elevado número de casos, afecta a individuos jóvenes aparentemente sanos. La naturaleza genética de estas patologías hace necesario el estudio de las bases moleculares y de los factores genéticos implicados en el desarrollo de la MSC. El avance en el conocimiento de dichos factores resulta fundamental tanto en el campo de la medicina forense, a la hora de esclarecer una muerte a la que no se le ha encontrado causa, como en la clínica para ayudar en la aplicación de la terapia más adecuada en el individuo afecto. El estudio genético de pacientes afectados por alguna de las patologías que pueden dar lugar a MSC, en muchas ocasiones como primera manifestación de las mismas, así como el estudio genético de las muestras forenses, resulta de gran utilidad no sólo para pacientes sino también para los familiares que podrán ser asesorados por un grupo multidisciplinar de profesionales médicos, genetistas, farmacéuticos y psicólogos, que evaluarán el riesgo en cada caso de forma individual y guiarán la terapia más adecuada. Así, el estudio de las bases genéticas, combinado con el seguimiento clínico de individuos afectados y familiares, permitirá establecer las correlaciones entre el genotipo y el fenotipo de las variantes encontradas. El esclarecimiento de estas correlaciones hará posible una mayor precisión en el diagnóstico, lo que facilitará tanto la elección de la terapia más adecuada en afectados y familiares portadores de la variante o variantes genéticas detectadas en el familiar afecto, como el conocimiento sobre el pronóstico en cada caso (siempre teniendo en cuenta que los factores ambientales pueden influir en dicho pronóstico).

Como se ha dicho anteriormente, la MSC puede tener lugar por un amplio rango de patologías y un número creciente de variantes genéticas en un amplio listado de genes, de tal modo que el estudio genético resulta complejo. Basándonos a esta complejidad nos hemos planteado una serie de objetivos, estructurados en tres bloques de acuerdo con los intereses planteados:

Bloque 1: El interés general del primer bloque de objetivos se centra en el conocimiento de las bases genéticas de las patologías que pueden dar lugar a Muerte Súbita Cardíaca (MSC) y el conocimiento de las estrategias de la biología molecular que pueden ser aplicadas al estudio genético de dichas patologías.

Los objetivos concretos de este primer bloque son:

1. Conocer las bases genéticas de la muerte súbita cardíaca, los síndromes y variantes genéticas implicadas.
2. Búsqueda de tecnologías genómicas que nos permitan el estudio genético de dichas patologías.

Bloque 2: El interés general del segundo bloque se centra en el desarrollo de estrategias de estudio genético para la detección de variantes genéticas implicadas en la muerte súbita cardíaca.

Los objetivos concretos de este bloque son:

1. Diseño de una estrategia de análisis de variantes genéticas implicadas en el desarrollo de Miocardiopatía Hipertrófica Familiar (MCH).
2. Diseño de una estrategia de análisis de variantes genéticas implicadas en el Síndrome de QT largo (SQTL) y Síndrome de Brugada (SBr).

Bloque 3: Por último, nos planteamos la aplicación del conocimiento generado en el bloque 1 de objetivos y los diseños desarrollados en el bloque 2, en tres estudios concretos: en casos clínicos de MCH; en MSC del adulto joven y en SMSL.

Los objetivos concretos de este tercer bloque son:

1. Aplicación de la estrategia de análisis de variantes implicadas en MCH a un caso clínico diagnosticado de MCH y estudio de cosegregación de las variantes en familiares.
2. Aplicación de las estrategias de detección de variantes genéticas implicadas en MCH y en canalopatías (SQTL y SBr) en casos de MSC en adultos jóvenes.
3. Aplicación de las estrategias de detección de variantes genéticas implicadas en MCH en casos de SMSL en recién nacidos.

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

1. MUESTRAS.

1.1. ASPECTOS ÉTICOS

El consentimiento informado fue firmado por los pacientes o por los padres o tutores legales en los casos de pacientes menores de edad. En el caso de muestras post mórtem, el consentimiento informado fue firmado por el familiar más cercano del fallecido.

Los modelos de consentimiento informado, uno para casos de muerte súbita en el adulto y un segundo modelo para casos de muerte súbita del lactante, se adjuntan en el apartado VII de “Anexos” de la presente tesis.

El protocolo fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (CEIC) y el estudio se lleva a cabo acorde a la declaración de Helsinki. Todos los individuos fueron evaluados y diagnosticados por cardiólogos y médicos forenses según protocolos de referencia [91] [8] [181] [182].

1.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

Los criterios de inclusión de las muestras en el estudio genético de la muerte súbita de adulto, fueron al menos uno de los siguientes:

- Historia personal de muerte súbita: En el estudio incluimos individuos que se han recuperado tras un episodio de muerte súbita y muestras forenses de pacientes, fallecidos sin que la muerte haya podido ser explicada tras la autopsia, de los que se ha extraído ADN a partir de tejido congelado, tejido embebido en bloque de parafina o sangre.
- Individuos diagnosticados de MCH, SQT, SBr o con síntomas cardíacos tales como síncope inexplicado.
- Historia familiar de muerte súbita: incluimos casos de familiares de primer y segundo orden asintomáticos en los que confirmamos o descartamos la variante genética que hemos detectado previamente en un familiar que ha sufrido una muerte súbita recuperada o no.

Incluimos muestras de pacientes asintomáticos que son familiares, de primer o segundo orden, de un caso de muerte súbita del que no poseemos muestra forense. Estas muestras se incluyen para tratar de descartar el mayor número posible de variantes genéticas en familiares. La

muerte súbita de un familiar provoca, además de una gran conmoción por tratarse de individuos aparentemente sanos y con frecuencia jóvenes, una gran aprensión y nerviosismo, de modo que, pese a no presentar síntomas, son incluidas en el estudio.

Se han analizado un total de 154 muestras de ADN de individuos adultos que cumplían alguna de las condiciones expuestas anteriormente. Estas muestras proceden de los siguientes institutos de medicina legal y centros hospitalarios de España: Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, Complejo Hospitalario de Ourense, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Hospital Comarcal de Monforte, Hospital Reina Sofía (Tudela), Hospital de la Ribera (Valencia), Hospital General Universitario de Alicante, Hospital Virgen de la Arrixaca (Murcia), Hospital Sta María de Rossel (Cartagena), IML de Valencia, IML de Granada, IML de Sevilla e INT de Sevilla.

Para la validación de la estrategia de detección de variantes genéticas implicadas en el desarrollo de MCH se utilizaron 1442 muestras que incluyen a pacientes diagnosticados de MCH y familiares recogidos por el Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña, una familia colombiana de 34 miembros y una familia de 14 miembros procedente de Italia.

Para el estudio del síndrome de muerte súbita del lactante se dispuso de un total de 344 muestras recogidas en el Instituto de Medicina Legal de Zurich (Suiza) y el Instituto de Medicina Forense de la Universidad de Bonn (Alemania).

Los informes de autopsia, la historia clínica personal y familiar fue recogida siempre que fue posible. Las circunstancias en que el evento cardíaco tuvo lugar (estrés, reposo, ejercicio...) fue tomada en cuenta a la hora de guiar el estudio genético de cada uno de los casos, tanto en casos de muerte súbita como en aquellos en que ésta fue recuperada. Desafortunadamente, esta información no estuvo disponible en la totalidad de los casos. En los casos en que no se dispuso de dicha información, o no de su totalidad, el estudio genético se realizó siguiendo todas las estrategias de análisis genético que hemos desarrollado.

2. EXTRACCIÓN DEL ADN.

La extracción de ADN a partir de sangre periférica se lleva a cabo con el kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega Corporation).

Si la extracción de DNA debe hacerse a partir de sangre congelada u otros tejidos recogidos en la autopsia, ésta se lleva a cabo mediante un protocolo con fenol-cloroformo.

La extracción de ADN a partir de tejido embebido en parafina se lleva a cabo tras una digestión con proteinasa K y una serie de centrifugaciones en que la muestra atraviesa filtros, de modo que se va aumentando la pureza del ADN final (dispositivos de *Amicon Ultra*, Millipore).

3. CUANTIFICACIÓN DEL ADN.

La cuantificación del ADN se realiza mediante el espectrofotómetro Thermo Scientific NadoDrop™ 1000 (*Thermo Fisher Scientific*) el cual, a partir de 1µl de muestra, cuantifica la concentración de ADN genómico de doble cadena (mide 2-3700 ng/µL en caso de ADN de doble cadena) y nos da una medida de la pureza del mismo mediante dos valores: el cociente entre la absorbancia Abs 260/280nm nos da una idea de la pureza de ADN y ARN; así, un valor aproximado de 1,8 es aceptado como ADN puro, de 2 es considerado ARN puro. Si el valor de este cociente es notablemente menor, podría tratarse de fenoles o proteínas contaminantes, que absorben cerca de los 280 nm. El cociente de absorbancia 260/230 es una medida secundaria de la pureza del ácido nucleico. El valor de este cociente debe oscilar entre 1,8-2,2; un valor considerablemente menor a éste puede ser indicador de la presencia de contaminantes co-purificados (Thermo Scientific- NanoDrop 1000. Spectrophotometer v3.7 User's manual).

4. ESTUDIO DE VARIANTES GENÉTICAS.

El estudio de variantes genéticas se lleva a cabo mediante la plataforma de alto rendimiento de genotipado Sequenom MassARRAY® System (*Sequenom Inc.*).

4.1. SELECCIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS.

El primer paso para el desarrollo de las estrategias consiste en la selección de las variantes que incluiremos en el estudio. Existen bases de datos que recogen la información actualizada de las variantes a medida que éstas se describen en la literatura científica. En ambas estrategias se seleccionaron por una lado mutaciones descritas como implicadas en el desarrollo de la patología en concreto y polimorfismos, que en un principio fueron consideradas variantes potencialmente mutagénicas o por su posible efecto modificador descrito en bibliografía. Estos polimorfismos incluidos serán indicadores en caso de haber contaminación. Además, serán de utilidad para un hipotético estudio poblacional futuro.

4.1.1. VARIANTES GENÉTICAS EN MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA FAMILIAR.

Se seleccionaron por un lado variantes genéticas implicados en el desarrollo de MCH y por otro polimorfismos con posible efecto modificador en genes sarcoméricos y en otros genes que, en el momento del diseño de la estrategia, se describieron como implicados en la patología. Desde entonces otros genes se han descrito como implicados en la patología. Como veremos, nuestra estrategia de detección de variantes es altamente flexible, de modo que podremos actualizarla con la adición de nuevos genes y nuevas variantes. La selección de variantes se llevó a cabo utilizando las siguientes bases de datos:

- Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.org/>) de la Universidad de Cardiff.
- cardiogenomics.med.harvard.edu/home patrocinada por el *National Heart Lung and Blood Institute- National Institutes of Health (U.S. Department of Health & Human Services)*.
- www.angis.org.au/Databases/Heart/heartbreak.html de la Universidad de Sídney.

El chip incluye 680 variantes genéticas en 16 genes: MYH7, MYBPC3, MYL2, MYL3, TNNT2, TNNI3, TNNC1, TPM1, ACTC, TTN, MYH6, PRKAG2, TCAP, GLA, MYO6 y MYLK2.

4.1.2. **VARIANTES GENÉTICAS EN EL SÍNDROME DE QT LARGO.**

La selección de variantes genéticas en los tres principales genes implicados KCNQ1, KCNH2 Y SCN5A se llevó a cabo mediante la base de datos Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.org/>) de la Universidad de Cardiff.

Estudiamos un total de 433 variantes genéticas en tres genes. De las variantes genéticas incluidas, la mayoría, un 79%, son sustituciones de una única base que da lugar a codones *missense* o *nonsense*, 5% corresponden a mutaciones de *splicing* y el 16 % restante se corresponde con variantes en que se delecionan o se insertan bases. En el gen KCNQ1 se analizan un total de 151 variantes genéticas, implicadas en LQT1; en KCNH2 se analizan 149 variantes, implicadas en LQT2; en SCN5A se incluyen 133 variantes, implicadas en LQT3 y en el Síndrome de Brugada.

4.2. **DISEÑO DE REACCIONES MULTIPLEX.**

Una vez hecha la selección de variantes en cada estrategia y creado el archivo con los fragmentos de 140 bases aproximadamente, se procede al diseño del ensayo. Éste se lleva a cabo mediante el programa de diseño MassARRAY assay design 3.1 (Sequenom, Inc.) que agrupa las variantes genéticas en *multiplexes*, es decir, en reacciones de genotipado múltiple en una única reacción. El programa diseñará la pareja de cebadores para la amplificación mediante PCR de cada una de las variantes y el cebador para la reacción de extensión SBE.

Los cebadores de la reacción de PCR comparten una secuencia común en el extremo 5' *ACGTTGGATG*, que permite unificar las condiciones de PCR. Los cebadores de la reacción de extensión llevan unidas colas no homólogas de distinto tamaño que hacen posible crear diferencias lo suficientemente grandes para analizar los resultados del espectrómetro de masas. Estas variaciones serán muy útiles a la hora de analizar los resultados ya que si el producto de extensión ha sido correctamente purificado, estas variaciones en masa permitirán alejar los cebadores no purificados del rango de masas en que estarán los picos correspondientes al producto de interés.

En la estrategia para detección de variantes genéticas en miocardiopatías estructurales, a la que llamaremos estrategia MCH, el diseño consiste en la detección de 680 variantes genéticas diferentes localizadas en 16 genes que son analizadas en 44 ensayos (plexes). Ocho de estas variantes son analizadas por duplicado a modo de control.

En la estrategia de detección de variantes genéticas de SQT, se diseñaron tres chips, uno por cada gen incluido en el estudio (KCNQ1, KCNH2 y SCN5A). El diseño final consiste en 382 amplicones distribuidas en 38 ensayos. En el gen KCNQ1 se analizan un total de 151 variantes genéticas, distribuidas en 14 ensayos, implicadas en LQT1; en KCNH2 las 149 variantes implicadas en LQT2 se distribuyen en 15 ensayos; en SCN5A las 133 variantes, implicadas en LQT3 y en el Síndrome de Brugada son analizadas en nueve ensayos.

4.3. DETECCIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS: SEQUENOM MASS ARRAY™ SYSTEM.

La tecnología iPLEX GOLD de Sequenom está diseñada para el genotipado de un número alto de muestras, de forma que, generalmente, se trabaja con placas de 96 y 384 pocillos y la transferencia, tanto de las muestras como de los reactivos, se lleva a cabo con robots pipeteadores. Las reacciones para el procesamiento de las muestras se llevan a cabo en termocicladores duales de 384 pocillos que permiten el genotipado de un alto número de muestras simultáneamente.

El protocolo de amplificación por PCR se lleva a cabo según las instrucciones del fabricante: La cantidad de ADN de partida será de 40 ng; se trabaja con 1X PCR buffer (2mM), MgCl₂ (2mM), dNTPs 500μM, 100 nM de cada cebador de PCR y 0.5 U de polimerasa *HotStar Taq*®. En las reacciones de más de 27 variantes la cantidad de enzima es el doble, es decir 1U. El volumen final de reacción es de 5μl.

El protocolo consiste en 1 ciclo de 4 minutos a 94°C; 45 ciclos de 20 segundos a 94°C; 30 segundos a 56°C y 1 minuto a 72°C; por último 1 ciclo de 3 minutos a 72°C.

Tras la PCR se elimina el exceso de dNTPs que no se han incorporado en la PCR mediante su defosforilación a través de un tratamiento enzimático con SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*). El volumen final de la reacción con SAP es de 7 μl, que incluyen los 5 μl de producto de PCR, 0,3 U de enzima SAP y 10X SAP Buffer. La reacción se incuba en un termociclador a 37°C durante 40 minutos seguido de una segunda incubación de 5 minutos a 85°C.

A continuación se lleva a cabo la reacción iPLEX. La concentración de los cebadores de extensión se muestra en el material adjunto en el apartado VII de “Anexos” de la presente tesis. El volumen de reacción será de 9 μl: 10X del tampón iPLEX Buffer, 1X de la mezcla de extensión iPLEX extension mix, 7 μM y 14 μM de la mezcla de cebadores (doble concentración en los cebadores *high mass* con respecto a los *low mass*) y 1X de termosequenasa, la enzima con que se lleva a cabo la reacción de extensión (es una ADN polimerasa). La tecnología iPLEX Gold presenta dos variantes en función del grado de *multiplex*; así, el grado de *multiplex* bajo (*low mass*) permite el genotipado de entre 1-18 variantes por reacción mientras el de grado alto (*high mass*) permite el genotipado de entre 19 y 36 variantes genéticas por reacción. En los ensayos de más de 18 variantes genéticas además de la enzima también se duplica el volumen de la mezcla de terminación de iPLEX.

El termociclador se programa en siete pasos, que enumeramos del I al VII:

I: 94°C durante 30 segundos; II: 94°C durante 5 segundos; III: 52°C durante 5 segundos; IV: 80°C durante 5 segundos; V: de nuevo volver a III cuatro veces; VI: volver a II 39 veces; VII: 72°C durante 3 minutos.

En la reacción de extensión, el cebador hibrida una base previa al locus en estudio. El genotipado de la muestra se lleva a cabo por la adición de un ddNTP al cebador de extensión, que será complementario a la base en estudio. Este ddNTP está modificado en masa tal y como se muestra en la tabla 8 a fin de aumentar la diferencia en masa entre las diferentes secuencias extendidas. El cebador de extensión es una base más larga tras la reacción de extensión. Esta base le confiere

una masa determinada, que será detectada por el espectrómetro MALDI-TOF MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*) que registra el tiempo de vuelo (Time Of Flight) del producto de extensión en el interior de una columna de vacío, tiempo que asocia a una masa que, a su vez, será asociada a un genotipo [183].

	Masa original (Da)	Masa Modificada (Da)	Diferencia en Masas(Da)			
			Adenina	Citosina	Guanina	Timina
Adenina	313,2	360,1	----	24	-16	-55.9
Citosina	289,2	384,1	-24	----	-40	-79.9
Guanina	329,2	344,1	16	40	----	-39.9
Timina	304,2	304,2	55.9	79.9	39.9	----

TABLA 8: Variaciones en masa de los ddNTPs para SBE- Sequenom MassARRAY® System.

En la figura 19 se muestra de forma esquematizada la reacción de genotipado iPLEX.

Tras la reacción de extensión se añade una resina para limpiar las sales del producto de la reacción iPLEX a fin de optimizar el análisis. Después, se dispensa la placa de 384 pocillos en un *SpectroCHIP bioarray* mediante el *MassARRAY Nanodispenser* (Sequenom, Inc.).

Como se señaló, la diferencia en masa tras la reacción de iPLEX es detectada por medio de *matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF), que permite llevar a cabo el genotipado automáticamente.

El programa de análisis *Typer analyzer v4.0.2* (Sequenom, Inc.) identifica los picos de acuerdo a las masas esperadas y asigna un genotipo.

El manejo y análisis de los datos obtenidos de la plataforma de genotipado se realiza mediante el SNPator (<http://www.snpator.com>), programa desarrollado por el Centro Nacional de Genotipado (CeGen) y el Instituto Nacional de Bioinformática (INB).

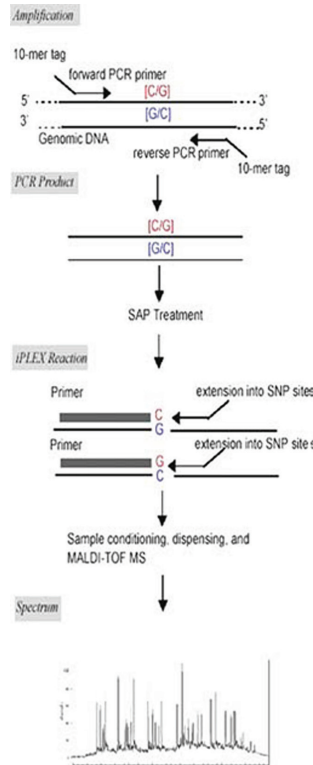


FIGURA 19: Esquema simplificado de la reacción de genotipado i-PLEX Gold. Fuente: Oeth, P., et al. (2009) [183]. En el primer paso (PCR) se amplifican las regiones de cada una de las variantes genéticas de interés. Tras este paso se incuban los productos con SAP para defosforilar los dNTP que no se hayan incorporado. A continuación, se lleva a cabo la reacción de extensión SBE de forma alelo-específica con nucleótidos terminadores modificados en masa. Tras la reacción de extensión, se diluye el producto de la reacción en 16 µl de agua y se eliminan las sales de los productos obtenidos mediante intercambio de cationes por medio de una resina. Seguidamente, es dispensado en un biochip. La masa de los alelos es asociada a un genotipo.

5. SECUENCIACIÓN DIRECTA.

Los protocolos de PCR de cada uno de los exones del gen KCNQ1 y KCNH2 se adjuntan en las tablas 9 y 10 y en las tablas 11 y 12 los programas de termociclador adecuados a cada exón. La polimerasa utilizada es la *AmpliTaq Gold® DNA Polymerase* de *Applied biosystems*. El volumen final de reacción es siempre de 25 µl, excepto en las muestras en que es necesario el uso de *Máster Mix* de *Quiagen* en que el volumen final de reacción tras la PCR es de 10 µl. El Kit comercial Taq- PCR Máster Mix de Quiagen contiene Taq ADN Polimerasa, tampón de PCR y dNTPs. La disolución final consta de 1.5 mM MgCl₂ y 200 µM de cada dNTP. Este kit es utilizado para la reacción de PCR de muestras en que la PCR tradicional no obtuvo resultados óptimos por presentar inhibidores de la reacción o por degradación del ADN de la propia muestra que, en muchas ocasiones, provienen de la extracción de ADN a partir de tejido conservado en etanol durante un largo periodo de tiempo o de tejidos embebidos en parafina. El exón 1 de ambos genes está siendo optimizado. Para la confirmación de las variantes detectadas en Sequenom utilizamos los cebadores de PCR diseñados para la amplificación en la plataforma de genotipado. El protocolo de PCR utilizado para confirmar por secuenciación directa de las variantes detectadas en la plataforma de genotipado y los protocolos de PCR realizada con el Kit de Máster Mix se adjuntan en las tablas 13/14 y 15/16, respectivamente, en las que se adjuntan, además, las condiciones de termociclador para cada caso. El diseño de los cebadores de PCR para la secuenciación de los genes KCNQ1 y KCNH2 se llevó a cabo mediante el programa *Primer Premier PREMIER biosoft International* y su especificidad se comprobó en el Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*) del National Center for Biotechnology Information (NCBI)-biblioteca Nacional de Medicina- Estados Unidos. La secuencia de estos cebadores se adjunta en las tablas 17 y 18.

CONDICIONES PCR KCNQ1													
	EXON 2	EXON 3	EXON 4	EXON 5, 6, 7	EXON 8	EXON 9	EXON 10	EXON 11	EXON 12	EXON 13	EXON 14, 15	EXON 16	
TAMPON	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X
dNTPS	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM
MgCl ₂	0,75 mM	0,75 mM	0,75 mM	0,75 mM	0,75 mM	0,75 mM	0,75 mM	0,75 mM	0,75 mM	0,75 mM	0,75 mM	0,75 mM	0,75 mM
CEBADOR	0,25 µM	0,25µM	0,25 µM	0,25 µM	0,25 µM	0,25 µM	0,3 µM	0,25 µM	0,25 µM	0,34 µM	0,25 µM	0,25 µM	0,25 µM
TAQ GOLD	1U/ 25µl	1U/ 25µl	1U/ 25µl	1U/ 25µl	1U/ 25µl	1U/ 25µl	1U/ 25µl	1U/ 25µl	1U/ 25µl	1U/ 25µl	1U/ 25µl	1U/ 25µl	1U/ 25µl

TABLA 9: Protocolo de PCR para amplificación exones de KCNQ1. | Todas las reacciones de PCR parten de 25 ng de ADN y el volumen final de reacción es de 25 microlitros.

CONDICIONES PCR KCNH2											
	EXON 2	EXON 3	EXON 4	EXON 5,6	EXON 7	EXON 8	EXON 9	EXON 10-11, 12-13	EXON 14	EXON 15	
TAMPON	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X
dNTPS	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM
MgCl ₂	1,5 mM	0,75 mM	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM	0,75 mM	0,75 mM	1,5 mM	1,5 mM	0,75 mM	0,75 mM
CEBADOR	0,3µM	0,3 µM 0,25µM	0,3µM	0,3µM	0,3µM	0,3µM 0,25µM	0,3 µM 0,34 µM	0,3µM	0,3µM	0,3µM	0,3µM 0,25µM
TAQ GOLD	1U/ 25µl	1U/ 25µl	1U/ 25µl	1U/ 25µl	1U/ 25µl	1U/ 25µl	1U/ 25µl	1U/ 25µl	1U/ 25µl	1U/ 25µl	1U/ 25µl

TABLA 10: Protocolo de PCR para amplificación exones de KCNH2. | Todas las s reacciones de PCR parten de 25 ng de ADN y el volumen final de reacción es de 25 microlitros.

EXÓN	INICIALIZACIÓN T _a (°C) y T _{po}	Nº CICLOS			ELONGACIÓN FINAL T _a (°C) y T _{po}	CONSERVACIÓN T _a (°C)
		DESNATURALIZACIÓN T _a (°C) y T _{po}	ALINEAMIENTO T _a (°C) y T _{po}	EXTENSIÓN T _a (°C) y T _{po}		
2	94°3'	94°30''	30 59°1'	72°1'	-	4°
3	94°3'	94°30''	30 57°1'	72°1'	12°30'	4°
4	94°3'	94°30''	30 65°1'	72°1'	-	4°
5,6,7	94°3'	94°30''	30 61°1'	72°1'	-	4°
8	94°3'	94°30''	30 57°1'	72°1'	-	4°
9	94°3'	94°30''	30 62°1'	72°1'	-	4°
10	94°3'	94°30''	30 57°1'	72°1'	-	4°
11	94°3'	94°30''	30 59°1'	72°1'	-	4°
12	94°3'	94°30''	30 57°1'	72°1'	-	4°
13	94°3'	94°30''	30 57°1'	72°1'	-	4°
14,15	94°3'	94°30''	30 57°1'	72°1'	-	4°
16	94°3'	94°30''	30 65°1'	72°1'	-	4°

TABLA 11: Condiciones del termociclador para KCNQ1 | T= temperatura (°C), Tpo= tiempo(minutos' /segundos' ' ').

EXÓN	INICIALIZACIÓN Tª (°C) y Tpo		Nº CICLOS			ELONGACIÓN FINAL Tª (°C) y Tpo	CONSERVACIÓN (T°C)
	DESNATURALIZACIÓN (Tª (°C) y Tpo)	ALINEAMIENTO Tª (°C) y Tpo	EXTENSIÓN Tª (°C) y Tpo				
2	95º10´	95º30´´	62º30´´	33	72º1´	72º7´	4º
3	94º5´	94º30´´	59º1´	36	72º1´	72º10´	4º
4	95º10´	95º30´´	59º30´´	33	72º1´	72º7´	4º
5,6	95º5´	95º30´´	60º1´30´´	33	72º1´30´´	65º10´	4º
7	95º10´	95º30´´	58º30´´	33	72º1´	72º7´	4º
8	94º5´	94º30´´	55º1´	36	72º1´	72º10´	4º
9	94º5´	94º30´´	55º1´	36	72º1´	72º10´	4º
10-11,12-13	95º10´	95º30´´	(59 o 60º)30´´	33	72º1´	72º7´	4º
14	95º5´	94º30´´	60º1´30´´	33	72º1´30´´	65º10´	4º
15	94º5´	94º30´	56º1´	36	72º1´	72º10´	4º

TABLA 12: Condiciones del termociclador para KCNHz. | T= temperatura (°C), Tpo= tiempo (minutos´ /segundos ´´´).

PROTOCOLO CONFIRMACIÓN SEQUEenom GENERAL			
ADN		25 ng	
TAMPON		1X	
dNTPs		200 µM	
Mg Cl ₂		0.75 mM	
CEBADOR		0.25 µM	
TAQ GOLD		1U/ 25µl	

TABLA 13: Protocolo de PCR para confirmación directa de las variantes detectadas en Sequenom Mass Array™.

INICIALIZACIÓN T _a (°C) y T _{po}	Nº CICLOS			ELONGACIÓN FINAL T _a (°C) y T _{po}	CONSERVACIÓN T _a (°C)
	DES NATURALIZACIÓN T _a (°C) y T _{po}	ALINEAMIENTO T _a (°C) y T _{po}	EXTENSIÓN T _a (°C) y T _{po}		
	94°30''	30	72°01'	-	4°

TABLA 14: Condiciones de termociclador para PCR de confirmación variantes Sequenom Mass Array™. | T= temperatura (°C), Tpo= tiempo (minutos' / segundos'').

Xº: La temperatura de *melting* depende de la secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR diseñados mediante el programa MassARRAY assay design 3.1 (Sequenom, Inc.)]

PROTOCOLO PCR MÁSTER MIX CONFIRMACIÓN SEQUEenom		
ADN		20 ng
MÁSTER MIX		0.8X
CEBADOR		0.25 µM

TABLA 15: Protocolo de PCR con Máster Mix para la confirmación por secuenciación directa de las variantes detectadas en Sequenom Mass Array™ | Volumen final de reacción 10 µl, El Kit comercial Taq- PCR Máster Mix de Qiagen contiene Taq ADN Polimerasa, Tampón de PCR y dNTPs. La disolución final consta de 1.5 mM MgCl2 y 200 µM de cada dNTP.

INICIALIZACIÓN T _a (°C) y Tpo	Nº CICLOS			ELONGACIÓN FINAL T _a (°C) y Tpo	CONSERVACIÓN T _a (°C)
	DES NATURALIZACIÓN T _a (°C) y Tpo	ALINEAMIENTO T _a (°C) y Tpo	EXTENSIÓN T _a (°C) y Tpo		
95°15´	94°30´´	35 58°1´30´´	72°1´30´´	72°10´	4°

TABLA 16: Condiciones del termociclador para PCR MÁSTER MIX de confirmación variantes detectadas en Sequenom Mass Array™. | T= temperatura (°C), Tpo= tiempo (minutos / segundos)

EXÓN	CEBADOR 1 (hacia delante o "forward primer" 5´-3´)	CEBADOR 2 (Reverso o "reverse primer" 5´-3´)	Tamaño Ampliación (pb)
2	CAGAGCCCGTGATGCTGAC	CAGCCATGCCCTCAGATGC	157
3	AAACAGGTTGCAGGGTCTGA	TTCTCTGGTCTGGAAACCTGG	251
4	CTCTTCCTGGGGCCCTGGC	TGGCGGGGGGAGCTTGTGGCACAG	171
5	AGCCCCACACCATCTCCTTC	GGCCCCGCACCCCTAAC	150
6	GGAGCCCGACACTGTGTGT	CTGCCCACTCTCAGCCT	230
7	TGGCTGACCACTGTCCCTCT	CCCCAGGACCCAGCTGTCCAA	195
8	GCAGTGGCCTGTGTGGA	AACACTGACCAAAATGACAGTGAC	187
9	TGGCTCAGCAGGTGACAGC	GACACAGGCTGTACCAAGCCAA	281
10	CCTGGCAGACGATGTCCA	CAACTGCTTGAGGGTTCT	215
11	CTGTCCCACTCTTCTCT	GAGCTCCAGTCCCTCCAG	194
12	TGGCCACTCACAACTCTCT	GCTTTGACACCCCTCCACTA	222
13	ACTGCCTGCACCTTTGAGCC	GTGAGGAGAAAGGGGTGGTT	303
14	CCAGGCCAGGTGTGAAC TG	TGGGCCCAGAGTAAC TGACA	120
15	GCCCTGATTTGGGTCTTTTA	GCAGGAGCTTCACGTTTACA	187
16	CACCACTGACTCTCTCGTCTGC	CCATCCCCCAGCCCCATC	297

TABLA 17: Cebadores PCR KCNQ1.

EXÓN	CEBADOR 1 (hacia delante o "forward primer" 5'-3')	CEBADOR 2 (Reverso o "reverse primer" 5'-3')	Tamaño amplicón (pb)
2	ACCTGTATCGGGGCACAC	GTACACCCCCACAGAAC	556
3	AGGGCGCAGGCACAT	GCAGAGCGTTGACCTTGA	425
4	CCCTCCTTCCCTTACCCA	ATAGGCGCAACAAGCCACT	716
5	GCCTCCGAACACCCTG	GACCTCCGCTCTGCCATT	733
6	GCTGAGGGGTGGGCATT	GGGCACTTTGGTGACGCTA	872
7	GACCTCTGATGCTCGCTCTG	CCCACCCCTTCAGTAGTCCC	661
8	TACAAGGGCGTCTCGTGG	AAGGGCTTCCATTTCCTCA	492
9	TGGGATGGTGGAGTAGAGTG	GGGCCTGAGTTTAGGTGAAT	476
10_11	CAGCTAGGGGACATGCT	AGTGGGCACACTGGAGGA	843
12_13	CGACTGGGGACAACCAG	CTCCGCGCTAGAGGTGTG	840
14	GGCTGCCACACCTCTAGC	GGAGGGCAGGAACAAGGT	441
15	GTCTCTCCCGTCCATCCTC	CAGCAAGTAAACAGTTACCCCTC	695

TABLA 18: Cebadores POR KCN12.

La secuenciación directa tanto para confirmar las variantes detectadas en la plataforma Sequenom Mass ArrayTM como la secuenciación directa de genes completos se lleva a cabo a partir del producto de PCR purificado mediante el kit de secuenciación *BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing* de Applied Biosystems.

El producto de PCR es disuelto en agua MiliQ y purificado en placas de filtración mediante *Multiscreen PCR µ96 Plate* de Millipore por medio de una bomba de vacío.

El protocolo de secuenciación se lleva a cabo según las indicaciones del fabricante. El termociclador se programa durante 3 minutos a 96°C seguido de 35 ciclos de: 30 segundos a 95°C; 15 segundos a 50°C; 4 minutos a 60°C. Finalmente la temperatura bajará a 4° hasta el siguiente paso que es la purificación del producto de la reacción de secuenciación. Ésta se lleva a cabo mediante encima SAP[®] (1U/µl) de USB[®] Corporation que incubaremos en el termociclador a 37°C durante 80 minutos seguido de 85° durante 15 minutos para luego descender la temperatura hasta los 4°C. A continuación se lleva a cabo una nueva purificación por filtración en placa mediante el kit *Montage SEQ96 Sequencing* en la *96wellSEQ plate* que forma parte de este kit de Millipore añadiendo solución de inyección (EDTA 0.3 mM autoclavada) al producto de la reacción con SAP. El volumen final de reacción está preparado para cargarse en el secuenciador.

La detección se realiza en un secuenciador 3730xl DNA analyser y las secuencias se analizan por medio del *SeqScape v2.5 software* de Applied Biosystems.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos generados directamente por la plataforma de genotipado MassArray System de Sequenom fueron transformados con la ayuda de las herramientas implementadas en SNPator (<http://www.snparator.com/>). Se trata de un entorno web orientado al análisis estadístico de datos genómicos desarrollado por el centro nacional de genotipado [184]. SNPator ha sido diseñado para ayudar a los usuarios a almacenar, manipular, recuperar, transformar y analizar sus datos, permitiendo realizar un conjunto elevado de operaciones, entre las que podemos citar: controles de calidad de genotipado (cálculo de tasas de éxito de genotipado), cambios de formato (por ejemplo, la creación de archivos de entrada de datos para diferentes programas de análisis), cálculos estadísticos genómicos (estudios de asociación, estima de haplotipos...).

En los casos en los que se detectó mediante secuenciación una nueva variante genética *missense* no incluida en las bases de datos, ni descrita en la literatura, PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) fue utilizado para predecir el posible impacto de en la estructura y función de la proteína. Esta predicción se basa en reglas empíricas sencillas que se aplican a la secuencia, la información filogenética y la información estructural que caracterizan a la sustitución aminoacídica.

IV. RESULTADOS.

El apartado de resultados lo hemos estructurado en tres bloques de acuerdo con los objetivos planteados en la presente tesis:

1. Bloque I:

1.1. Artículo 1: Molecular genetics of sudden cardiac death.

En este artículo publicado en la revista *Forensic Science International* se revisan las principales patologías implicadas en la MSC y las bases genéticas de las mismas. Se trata de patologías hereditarias que pueden cursar desde fenotipos morfológicos severos, detectables en ECO o en la autopsia médico-legal hasta la total ausencia de éstos. Se plantea, fundamentalmente, la problemática que supone la MSC en la praxis forense y la necesidad del estudio de las bases genéticas y moleculares implicadas en las diferentes patologías que ayude a esclarecer las causas de estas muertes. Se hace hincapié en la importancia del estudio genético en familiares a fin de identificar portadores de variantes genéticas que pueden estar en riesgo de sufrir una MSC (pese a que las correlaciones genotipo-fenotipo son desconocidas en la mayoría de las variantes genéticas descritas).

Se trata de una revisión llevada a cabo en el año 2008. Desde entonces se han descrito nuevos genes como implicados en diferentes patologías que dan lugar a MSC. Este es el caso del Síndrome de QT Largo en el que habían sido descritos 10 subtipos en función del gen implicado. Hoy ya son 12 tipos de SQT (desde LQT1 hasta LQT12) y cabe esperar que este número aumente.



Review

Molecular genetics of sudden cardiac death

María Sol Rodríguez-Calvo^{a,*}, María Brion^b, Catarina Allegue^c, Luis Concheiro^a, Angel Carracedo^a^a Institute of Legal Medicine, University of Santiago de Compostela, Spain^b Hospital-University Complex of Santiago (CHUS). Genomic Medicine Group, University of Santiago de Compostela, Spain^c Genomic Medicine Group, University of Santiago de Compostela. CIBERER, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 July 2008

Accepted 15 September 2008

Available online 7 November 2008

Keywords:

Sudden cardiac death

Molecular genetics

Myocardial disease

Channelopathies

ABSTRACT

Sudden cardiac death (SCD) is one of the most common causes of death. An important number of sudden deaths, especially in the young, are due to genetic heart disorders, both with structural and arrhythmogenic abnormalities. In recent years, significant advances have been made in understanding the genetic basis of SCD. Identification of the genetic causes of sudden death is important because close relatives are also at potential risk of having a fatal cardiac condition. A comprehensive post-mortem investigation is vital to determine the cause and manner of death and provides the opportunity to assess the potential risk to the family after appropriate genetic counselling.

In this paper, we present an update of the different genetic causes of sudden death, emphasizing their importance for the forensic pathologist due to his relevant role in the diagnosis and prevention of SCD.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	1
2. Genetics of sudden cardiac death	2
3. Myocardial disease and sudden death	2
3.1. Hypertrophic cardiomyopathy	3
3.2. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia	4
4. Sudden death with a morphologically normal heart	5
4.1. Long QT syndrome	6
4.2. Brugada syndrome	7
4.3. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia	7
4.4. Short QT syndrome	8
5. The pathologist responsibilities in the diagnosis and prevention of sudden death	8
Acknowledgements	9
References	9

1. Introduction

Sudden death is a tragic complication of a variety of medical disorders, although its origin is mainly represented by cardiovascular diseases. In fact, sudden cardiac death (SCD) is one of the most common causes of death in developed countries, showing

as a major health problem. Recent studies indicate an incidence of 30–200/100,000 people each year [1], causing about 335,000 deaths each year in the USA. In Europe, the incidence is clearly higher in Northern countries. In this regard, the Spanish Study on Sudden Death [2] showed an incidence in the lowest range of 40/100,000 individuals each year, a figure that still represents 10% of all deaths.

In most cases of sudden death, cause and manner of death can be established, with many attributable to cardiac abnormalities evident at autopsy [3,4]. A significant number of SCD, however, particularly in young people, remains unexplained following a comprehensive medico-legal investigation, including autopsy and

* Corresponding author at: Institute of Legal Medicine, Faculty of Medicine, C/San Francisco s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain. Tel.: +34 981582327; fax: +34 981580336.

E-mail address: msol.rodriguez@usc.es (M.S. Rodríguez-Calvo).

laboratory tests. Perhaps the most important unsolved challenge in the practice of forensic pathology is the failure to determine a cause of death, particularly in a previously healthy young person who has died suddenly and unexpectedly.

In a typical forensic pathologist practice, approximately 50% of deaths are natural, 5–10% are unexplained after a gross autopsy, and 1–5% are negative after completion of the gross and microscopic autopsy and other laboratory tests [5]. The percentage of unexplained sudden deaths is variable according to the age group included in the study and the diagnostic criteria. Recent population-based studies [6–9] showed that at least 3%, and perhaps as many as 30%, of sudden deaths involving children and young adults have no identifiable morphologic abnormalities found at autopsy, and the SCD is labelled as sudden unexplained death (SUD).

Causes of sudden cardiac death differ with the age of the patient. In the adult population, the most frequent cause of sudden death is coronary heart disease, with various forms of cardiomyopathies being the second most common cause [1,10]. Nevertheless, in subjects <35 years of age, many other aetiologies have been shown to contribute to this problem, most of them of non-ischaemic nature [11–14]. Under 1 year old, the first cause of death is the sudden infant death syndrome (SIDS), defined as one where the cause of death remains unexplained after a thorough post-mortem examination. After the first year, in children and adolescents, hypertrophic cardiomyopathy, arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, myocarditis and congenital coronary anomalies are frequent substrates for lethal arrhythmias.

Non-ischaemic causes of sudden cardiac death are of major importance because they often include genetic diseases [15]. It is also important to stress that these causes of sudden death present a diagnostic challenge for pathologists because they can present with minimal findings or even as a morphologically normal heart. The diagnosis of cardiomyopathies can be difficult in view of their variation in phenotypic expression, and in the case of arrhythmogenic abnormalities there are no structural findings to aid in the diagnosis [16].

Diagnosis of the genetic causes of sudden death is important because close relatives are also at potential risk of having a fatal cardiac condition. A comprehensive post-mortem investigation is vital to determine the cause of death and provides the opportunity to assess the potential risk to the family after appropriate genetic counselling. Effective evaluation of relatives, guided by genetic testing, can therefore prevent further deaths in the family.

2. Genetics of sudden cardiac death

Over the last decade, significant advances have been made in understanding both the clinical and genetic basis of sudden cardiac death. Many of the causes of sudden death, especially in the young, are due to genetic heart disorders (Fig. 1), which can be broadly categorized into those in which structural abnormalities are prominent, such as Hypertrophic Cardiomyopathy and Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy, or diseases in which there is a primary arrhythmogenic abnormality, which include long QT syndrome, Brugada syndrome, Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia and short QT Syndrome [15]. For nearly half of young victims from 1 to 35 years of age, it affects people in good health and occurs without warning symptoms, thus placing extreme importance upon medico-legal investigation and autopsy to determine the cause and manner of death [4]. In addition, the diagnosis using macro and microscopic findings can be difficult in some cases. Medico-legal investigation in cases of SCD can benefit from the so-called “molecular autopsy” by the analysis of genes involved in the condition, decreasing the percentage of negative autopsies and providing essential information to relatives [16,17]. Identification of the genetic basis of sudden cardiac death is the cornerstone of management for families in which sudden death has occurred.

3. Myocardial disease and sudden death

The role of genetic factors in the pathogenesis of cardiomyopathies has received growing attention during the past 15 years and considerably improved our knowledge of these diseases. Cardiomyopathies are defined as diseases of the myocardium with cardiac dysfunction and can be complicated by heart failure, arrhythmias, and sudden death [18]. In 1995, the World Health Organization (WHO)/International Society and Federation of Cardiology (ISFC) task force recommended that the cardiomyopathies be classified into two main groups: specific cardiomyopathies, and primary cardiomyopathies. Primary cardiomyopathies are diseases intrinsic to the myocardium itself and are classified pathophysiologically into four main distinct entities: dilated cardiomyopathy (DCM), hypertrophic cardiomyopathy (HCM), restrictive cardiomyopathy (RCM), and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC). This nomenclature has been upheld in the most recent American College of Cardiology/European Society of Cardiology expert consensus document of 2003 [19], although, with expanding knowledge of the

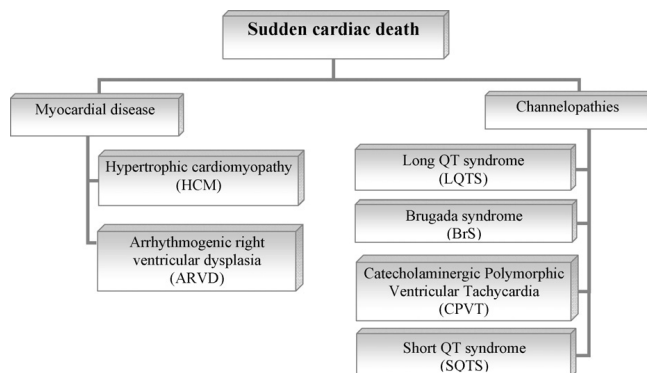


Fig. 1. Genetic causes of sudden cardiac death.

genetic background of these diseases, new classifications have recently been proposed by American and European expert panels [20,21].

The diagnosis of cardiomyopathies can be difficult in view of their variation in phenotypic expression. Furthermore, cardiomyopathies are characterized by a great genetic heterogeneity at both allelic and non-allelic levels. The most frequent cardiomyopathies revealed by sudden death are hypertrophic cardiomyopathy and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Depending on the population studied, these are the leading causes of sudden death in young people.

3.1. Hypertrophic cardiomyopathy

HCM is a clinically heterogeneous but relatively common autosomal dominant genetic disease with a prevalence of 1:500 in a general population of healthy young adults [22]. It is the most prevalent genetic cardiovascular disease, and more importantly is the most common cause of sudden cardiac death in the young, including trained athletes [23], although it may cause sudden death at any age and a proportion of SIDS cases may be associated with HCM mutations [24].

Population-based studies of the natural history of HCM reveal that the annual mortality rate of patients with HCM attending tertiary referral centers may be as high as 2–4% [25,26] and up to 6% in childhood [27]. However, in the general community, morbidity and mortality for HCM is much lower, reflecting a more benign prognosis for this disease [28,29].

Hypertrophic cardiomyopathy is a myocardial disease defined by an unexplained left ventricular hypertrophy (LVH), usually asymmetrical and involving the interventricular septum. The symmetrical form of HCM accounts for over one third of cases and is characterized by concentric thickening of the left ventricle with a small ventricular cavity dimension [30]. HCM may affect any portion of the left ventricle and several unusual and rare morphological variants of HCM have been described. These include HCM with either mid-ventricular cavity obstruction or apical hypertrophy [31]. The morphological spectrum of HCM is further complicated by the observation that HCM may progress to a dilated or “burnt out” phase in approximately 10% of patients and resemble DCM [23].

Histopathological hallmarks of HCM are myocyte hypertrophy with myocardial disarray and increased interstitial fibrosis. Small vessel disease or arterial dysplasia is another pathological feature of HCM [23].

HCM exhibits an enormous phenotypic and genotypic heterogeneity whereby different genes or different mutations in the same gene may give rise to different cardiac morphologies as well as differences in disease severity and prognosis. Anatomically/physiologically, HCM can manifest with negligible to extreme hypertrophy, minimal to extensive fibrosis and myocyte disarray, absent to severe left-ventricular outflow tract obstruction, and distinct septal contours/morphologies. The clinical course also varies extremely, ranging from an asymptomatic lifelong course to severe symptoms such as dyspnea or angina and to sudden death as the sentinel event. Sudden death is the mode of presentation for more than 50% of patients with HCM [23].

The genetic aspect of HCM is characterized by a high heterogeneity both at the allelic and non-allelic level. Since the discovery of the first mutation in the beta-myosin heavy chain gene in a large French-Canadian family in 1990 [32], a large number of mutations on different genes encoding sarcomeric proteins has been found, which has led to the definition of primary HCM as a disease of the sarcomere. However, in recent years, several new mutations

in genes encoding Z-line, calcium-handling and mitochondrial proteins have been identified.

The most common genetically mediated form of HCM is myofibrillar HCM, with hundreds of disease-associated mutations in eight genes encoding proteins critical to the sarcomere's thick myofibrillar [β -myosin heavy chain (MYH7) [32], regulatory myosin light chain (MYL2) and essential myosin light chain (MYL3)] [33], intermediate myofibrillar (myosin binding protein C; MYBPC3) [34] and thin myofibrillar [cardiac troponin T (TNNT2), α -tropomyosin (TPM1) [35], cardiac troponin I (TNNI3), [36] and actin (ACTC)] [37,38]. Targeted screening of giant sarcomeric TTN-encoded titin, which extends throughout half of the sarcomere, has so far revealed only two mutations responsible for HCM [39]. More recently, mutations have been described in the myofibrillar protein α -myosin heavy chain encoded by MYH6 [40] and in cardiac troponin C (TNNC1) [41] (Table 1).

The distribution of the disease genes by identification of pathogenic mutations was extensively determined in several Caucasian populations. In all cohorts, MYBPC3 and MYH7 were the most common genes responsible for the disease, each of them being involved in 30–40% of genotyped index patients. TNNT2, TNNI3, TPM1, ACTC, MYL2, and MYL3 are involved in 1–5% of cases [42–46]. The other genes are reported only in few cases not allowing cosegregation analysis.

This genetic diversity is compounded by considerable intra-genetic heterogeneity, with more than 500 mutations now identified. These most commonly are missense mutations but include insertions, deletions, and splice (split-site) mutations encoding truncated sarcomeric proteins.

Hypertrophic cardiomyopathy is a familial disease in at least 50% of cases, with a penetrance of the disease dependent on age and gender. Most of the patients are heterozygous for the mutation, which segregates as an autosomal dominant trait, the mutation being transmitted by one of the parents. However, some de novo mutations have also been reported [47,48]. In some cases (3–5%), 2 different mutations may be present in the same individual, most often in MYH7 and MYBPC3, leading to compound heterozygous patients (2 heteroallelic mutations in the same gene), double heterozygous patients (2 heterozygous mutations in 2 different genes), or homozygous patients (same mutation on the 2 alleles of the same gene) [42,49,50]. This finding must be taken into account in the context of the genetic counselling.

Due to the genetic heterogeneity and the variable clinical expressivity of these diseases, the relationship between genotype and phenotype remains complex, but the degree of hypertrophy, the age of onset, the severity of the symptoms and prognosis have been shown to be, at least in part, related to the precise gene mutations. For example, mutations in troponin T cause only mild or subclinical hypertrophy yet are associated with a poor prognosis and a high risk of sudden death. In contrast, mutations in myosin

Table 1
Sarcomeric genes involved in myofibrillar-HCM.

Gene	Protein	Locus	Frequency (%)
MYH7	β -Myosin heavy chain	14q11.2-q12	15–25
MYH6	α -Myosin heavy chain	14q11.2-q12	<0.5
MYL2	Regulatory light chain	12q23-q24.3	<1
MYL3	Essential light chain	3p21.2-p21.3	<1
MYBPC3	Myosin binding protein C	11p11.2	15–25
TNNT2	Cardiac Troponin T	1q32	5–15
TNNI3	Cardiac Troponin I	19p13.4	<5
TNNC1	Cardiac Troponin C	3p21-p24	<0.5
TPM1	α -Tropomyosin	15q22.1	5–15
ACTC	α -Actin	15q14	<0.5
TTN	Titin	2q24.3	<0.5

binding protein C are associated with mild disease and onset in middle age or late adult life. Similarly, genotype–phenotype correlation studies have led to the discovery of “malignant” mutations in the cardiac β -myosin heavy chain gene, which cause a severe form of HCM with early onset, complete penetrance, and increased risk of sudden cardiac death. Conversely, other mutations are associated with an intermediate or a benign clinical course [51–58]. Nevertheless, genotype–phenotype studies involving a large cohort of unrelated patients have indicated that great caution must be exercised in assigning particular prognostic significance to any particular mutation [59–61]. Furthermore, those studies have demonstrated that the two most common forms of genetically mediated HCM, MYH7 HCM and MYBPC3 HCM, are phenotypically indistinguishable [62]. Finally, patients with double mutations generally exhibit a more severe form of HCM than patients with single gene defects; this is especially true for homozygous patients [42,49].

The prevalence of mutations in the eight most common myofibrillar-associated genes, in different international cohorts, ranges from 30 to 70%, still leaving a large number of patients with genetically unexplained disease [63]. A recent study showed that the morphology of the septum hypertrophy could predict the yield of mutations found in the sarcomeric genes [64].

Over the past few years, the spectrum of HCM-associated genes expanded outside the myofibrillar to encompass additional subgroups that could be classified as “Z-disc HCM”, “calcium-handling HCM”, and “metabolic HCM”; all genes currently implicated in the pathogenesis of HCM are shown in Tables 1 and 2.

Recently, it has become clear that HCM may also be caused by mutations in genes encoding proteins of the Z-disc. Mutations were described initially in muscle LIM protein encoded by CSR3 [65] and telethonin encoded by TCAP [66]. LDB3-encoded LIM domain binding 3, ACTN2-encoded alpha actinin 2 and VCL-encoded vinculin/metavinculin have recently been added to that list [67–69].

Calcium and proteins involved in calcium-induced calcium release have always been of great interest in the pathogenesis of HCM. Although with very low frequency, mutations have been described in the promoter and coding-region of PLN-encoded phospholamban, an important inhibitor of cardiac muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) [70,71], as well as in the RyR2-encoded cardiac ryanodine receptor [72]. Recently, three novel mutations were discovered in JPH2-encoded junctophilin 2 in three previously genotype-negative patients with HCM [73].

Table 2
Other genes involved in HCM.

Gene	Protein	Locus	Frequency (%)
Z disc-HCM			1-5
LBD3	LIM binding domain 3 (ZASP)	10q22.2-q23.3	
CSR3P	Muscle LIM protein	11p15.1	
TCAP	Telethonin	17q12-q21.1	
VLC	Vinculin/Metavinculin	10q22.1-q23	
ACTN2	Alfa-Actinin 2	1q42-q43	
Calcium release-HCM			1-5
RyR2	Cardiac Ryanodine receptor	14q21.1-q43	
JPH2	Junctophilin 2	20q12	
PLN	Phospholambdan	6q22.1	
Metabolic-HCM			<1
PRKAG2	AMP-activated protein kinase	7q35-q36.36	
LAMP2	Lysosome-associated membrane p. 2	Xq14	
GLA	Alfa Galactosidase A	Xq22	
FXN	Frataxin	9q13	

Another genetic subgroup of HCM is that of metabolic HCM, involving mitochondrial and lysosomal proteins. Previous studies have shown glycogen storage diseases mimicking HCM with mutations in PRKAG2-encoding protein kinase gamma 2 and LAMP2-encoding lysosome-associated membrane protein 2 [74]. In 2005, a mutation in FXN-encoded frataxin was described in a patient with HCM [75]. Similar to PRKAG2 and LAMP2, Fabry's disease can express predominant cardiac features of left ventricular hypertrophy. Mutations in GLA-encoded alpha-galactosidase A have been found in patients with this multisystem disorder [76]. Compared with myofibrillar-HCM, Z-disc, metabolic and calcium handling-HCM account for a relatively small percentage of HCM.

Genomic medicine has entered clinical practice and the diagnostic utility of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy is clearly evident, but with the growing number of hypertrophic cardiomyopathy-associated genes strategic choices have to be made. Recent genotype–phenotype studies have discovered an important relationship between the morphology of the left ventricle, its underlying genetic substrate and the long-term outcome of this disease. A clear picture is emerging that the two most common anatomical/morphological subtypes of HCM (reverse curve and sigmoidal HCM) largely emanate from fundamentally distinct pathogenetic mechanisms. Herein, most (but not all) of reverse curve HCM is indeed a “disease of the sarcomere” and most (but not all) sigmoidal HCM is in search of its aetiology [64].

As of today, genetic analysis in HCM allows identification of the genetic defect in a high percentage of patients. Molecular data contribute to the management of patients because they allow presymptomatic diagnosis and identification of silent mutation carriers and patients for whom reproductive counselling may be appropriate [77].

Once a mutation has been identified in an index patient, genetic counselling and testing can be proposed to the apparently healthy relatives, in order to know if they carry the mutations and if they have a risk of developing the disease later on. In other situations, molecular analysis can help to distinguish other causes of hypertrophy from HCM. Finally, genetic testing may sometimes help the clinician to better stratify the risk of sudden death in patients with HCM.

3.2. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia

Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia (ARVC/D) is an inherited heart muscle disease that predominantly affects the right ventricle (RV). The estimated prevalence of ARVC/D in the general population ranges from 1 in 2000 to 1 in 5000. The disease affects men more frequently than women, with an approximate ratio of 3:1. A recognized cause of sudden cardiac death in the young, it is also regarded as the most common cause of sudden death in competitive athletes in Italy [78].

The disease is characterized pathologically by a peculiar myocardial atrophy with fibro-fatty replacement of the RV free wall, advancing from the epicardium to endocardium, resulting in regional or global abnormalities. ARVC has a predilection for certain sites within the right ventricle and wall aneurysms tend to be located in the apical, inflow, and infundibular regions of the right ventricle—the so-called “triangle of dysplasia”. Evidence of LV involvement with fibro-fatty substitution and chamber enlargement is reported in up to 75% of patients [79]. The intraventricular conduction delay, consequent to fibro-fatty replacement, is a source of electrical instability, due to reentrant phenomena, leading to ventricular arrhythmias with left bundle branch block morphology, indicating a right ventricular origin.

Clinical diagnosis of ARVC/D is often difficult because of the nonspecific nature of disease features and the broad spectrum of

phenotypic manifestations. The clinical presentation is highly variable but characterized mainly by ventricular tachyarrhythmias, syncope, and sudden cardiac death (SCD) that may be precipitated by exertion. Molecular genetic studies have provided new insights in understanding the pathophysiology of ARVC/D, showing that it is a desmosomal disease resulting from defective cell adhesion proteins such as junction plakoglobin (JUP), desmoplakin (DSP), plakophilin-2 (PKP2), desmoglein-2 (DSG2) and desmocollin-2 (DSC-2) [80–84].

A familial background has been demonstrated in >50% of ARVC/D cases. The disease is usually inherited as an autosomal dominant trait with incomplete penetrance and variable expression. The first chromosomal locus (14q23–q24) was published in 1994 after clinical evaluation of a large Italian family [85]. Subsequently, linkage analysis provided evidence for genetic heterogeneity with sequential discovery of several ARVC/D loci on chromosomes 1, 2, 3, 6, 10, 12, and 14. An autosomal recessive variant of ARVC/D (so-called Naxos disease) in which there is a cosegregation of cardiac (ARVC/D), skin (palmoplantar keratosis), and hair (woolly hair) abnormalities has been mapped on chromosome 17 (locus 17q21). The first disease-causing gene, the JUP gene, was identified by McKoy et al. [80] in patients with Naxos disease. The gene encodes the desmosomal protein plakoglobin, a major constituent of cell adhesion junction. Its discovery suggested that ARVC/D is a cell-to-cell junction disease and stimulated the research in other related genes. More recently, mutations of desmoplakin (DSP) [81] and plakophilin-2 (PKP2) [82] genes have been found in ARVC, in the absence of skin and hair abnormalities, although a homozygous desmoplakin mutation has also been reported in Carvajal syndrome, which is characterized by hair and skin disorders associated with cardiac disease [86]. DSP, JUP, and PKP2 are proteins of the intercellular junctions (fascia adherens and desmosome), which are responsible for the mechanical coupling of the myocytes and provide a continuous cell-to-cell connection to sarcomeric actin and intermediate filaments. The involvement of genes encoding desmosomal proteins in ARVC suggested that impaired cell adhesion might be among primary molecular defects. Desmosomal adhesion is mediated by calcium-dependent cell adhesion glycoproteins (cadherins) of the desmocollin (DSC) and desmoglein (DSG) types, which interact laterally and transcellularly. Both desmosomal cadherins types are encoded by a small multigene family on chromosome 18q12.1, each of which consists of cell type-restricted members. Unlike other cadherins that are restricted to stratified epithelial tissues, DSG2 and DSC2 are expressed in all desmosome-possessing tissues, including myocardium and epithelia. Both desmoglein-2 gene (DSG-2) and desmocollin-2 (DSC-2) mutations have been found in ARVC/D unrelated probands [83,84].

Autosomal dominant ARVC/D has been linked to other genes unrelated to cell adhesion complex, such as the gene encoding for cardiac ryanodine receptor (RyR2) [87], which is responsible for calcium release from the sarcoplasmic reticulum, and the transforming growth factor- β 3 gene (TGF β 3) [88], which regulates the production of extracellular matrix components and modulates expression of genes encoding desmosomal proteins (Table 3).

Mutation screening of the 5 desmosomal genes hitherto implicated in ARVC/D, in a recent UK referral center sample, allowed successful genotyping of ~30% [89]. In a contemporaneous Italian series, mutation screening of the “big 3” ARVC/D genes (i.e., desmoplakin, plakophilin [PKP]-2, and desmoglein-2, in order of frequency) allowed successful genotyping of 32 of 80 unrelated index cases (40%). Inclusion of TGF- β 3 effected a modest increase in the detection rate to 42.5% [83,90]. The frequency of mutations in PKP-2 has been explored in other cohorts. Gerull et al. [82] first reported 27% prevalence of PKP-2 defects in 120 unrelated index

Table 3
Genes involved in arrhythmogenic right ventricular dysplasia.

Gene	Protein	Locus	Frequency (%)
C/DAVD			
PKP2 (ARVD9)	Plakophilin-2	12p11	14–43
DSP* (ARVD8)	Desmoplakin	6p24	15
DSG2 (ARVD10)	Desmoglein-2	18q12.1–q12.2	10
DSC2 (ARVD11)	Desmocollin-2	18q21	–
TGF β 3 (ARVD1)	Transforming growth factor- β 3	14q23–q24	2.5
RyR2 (ARVD2)	Cardiac ryanodine receptor	1q42–q43	–
Naxos disease			
JUP	Junction plakoglobin	17q21	–

cases of western European descent with ARVD/C. Two new reports in USA [91] and Dutch [92] cohorts confirm and extend these previous observations by showing that PKP2 gene mutations are commonly found in ARVC/D patients, accounting for >40% of the cases. A lower prevalence of mutant PKP2 gene has been reported in other series (11 and 16%, respectively) [83,93]. This discrepancy may be explained by geographic factors, small sample size, and patient selection bias.

These studies show that mutations in the plakophilin-2 gene are the most prevalent. Current pathophysiological insights suggest a final common pathway in which plakoglobin release from the desmosome, independent of the primarily affected desmosomal protein, results in desmosome impairment, intercalated disc remodeling and Wnt/ β -catenin pathway signalling defects [94].

Gene identification studies in ARVC/D are ongoing, with additional components of the desmosome-intermediate filament complex and associated proteins being the primary candidates. Comprehensive screening of all known and candidate genes is likely to place the detection rate firmly in the 40–50% range, sufficient to justify clinical application in the near to immediate future [95].

As of today, the importance of knowing the genetic defect relies very much on the possibility of evaluating family members to establish the diagnosis in clinically borderline cases, silent carriers, and asymptomatic individuals and to allow reproductive counseling [77]. At present, data from genotype–phenotype studies are too limited to permit speculation on the possible impact of genetic analysis on risk stratification or therapy.

4. Sudden death with a morphologically normal heart

Sudden deaths do occur in cases in which, despite taking adequate histology of the heart, no structural abnormality is found and toxicology is negative. Population-based studies show that a significant number of sudden deaths (at least 10% and perhaps up to 30%), especially in the young, remain unexplained following a comprehensive post-mortem investigation and further suggest that a considerable number of these sudden deaths may be associated with heritable channelopathies [16]. It is being increasingly recognized that gene defects in ion channels in the myocyte lead to rhythm disturbances, ECG abnormalities and a risk of sudden death as the most severe clinical manifestation, but no morphological abnormality in the heart [96].

There is a growing list of inherited and congenital arrhythmia disorders caused by mutations in genes encoding defective ionic channel proteins, governing cell membrane transit of sodium, potassium and calcium ions. These ion channel disorders include long QT syndrome (LQTS), short QT syndrome (SQTS), Brugada syndrome, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT). Nocturnal sudden unexplained death syndrome in

young Southeast Asian males and Brugada syndrome are based on similar clinical and genetic profiles. A small proportion (5–10%) of sudden infant deaths also may be linked to ion channelopathies [97].

Potentially lethal channelopathies leave no evidence to be found during a comprehensive medico-legal autopsy, leaving forensic pathologists only to conjecture that a fatal arrhythmia might be responsible for the SUD [3,98,99]. However, a post-mortem genetic analysis (i.e., molecular autopsy) may potentially substantiate the pathogenic basis for a SUD.

4.1. Long QT syndrome

Congenital LQTS comprises a distinct group of cardiac channelopathies characterized by delayed repolarization of the myocardium, QT prolongation, a specific form of polymorphic ventricular tachycardia (Torsade des Pointes) and increased risk for syncope, seizures, and sudden cardiac death in the setting of a structurally normal heart [100]. It is a genetically heterogeneous disease affecting 1 in 5000 persons, with a natural history ranging from sudden death in infancy to asymptomatic longevity [101]. LQTS is also an important cause of unexplained sudden cardiac death in the young. Phenotypic expression (on the ECG) varies considerably, and ≈25–50% of affected family members may show borderline or even normal QT intervals. Aborted cardiac arrest or sudden death is the sentinel event in 5–10% of LQTS cases [102].

Two patterns of inheritance have been described in LQTS: a rare autosomal recessive disease associated with deafness (Jervell and Lange-Nielsen Syndrome) [103], and the much more common autosomal dominant disease unassociated with deafness (Romano–Ward Syndrome) [104,105].

Long QT syndrome displays great genetic heterogeneity. The first locus for the autosomal dominant disease of long QT was mapped to chromosome 11 in 1991 [106]. Since then, more than 500 mutations distributed in 10 genes have been described in this condition: *KCNQ1* [107], *HERG* [108], *SCN5A* [109], *KCNE1* [110], *KCNE2* [111], *ANKB* [112], *KCNJ2* [113], *CACNA1* [114], *CAV3* [115] and *SCN4B* [116] (Table 4).

Approximately 75% of LQTS is caused by mutations in 5 cardiac channel-encoding genes: *KCNQ1* (LQT1), *KCNH2* (LQT2), *SCN5A* (LQT3), *KCNE1* (LQT5) and *KCNE2* (LQT6), encoding for critical ion-channel subunits that are responsible for the orchestration of the cardiac action potential [117–119]. Genes encoding potassium channels *KCNQ1* and *KCNE1* interact to form the cardiac IKs (inward slow potassium) current; *HERG* and *KCNE2* integrate to form the IKr (inward rapid potassium) current and *SCN5A* encodes the sodium channel. Mutations in *ANK2*-encoded ankyrin B (LQT4)

account for the extremely rare, nonchannel subtype of LQTS [112]. Mutations in the *KCNJ2*-encoded Kir2.1 potassium channel are responsible for Andersen-Tawil syndrome (ATS1, formerly called LQT7), which is associated with periodic paralysis, cardiac arrhythmias and dysmorphic features [113], whereas a mutation in the *CACNA1C*-encoded L-type calcium channel which leads to reduced calcium channel inactivation mediates Timothy syndrome (TS1, formerly called LQT8), the most malignant form of LQTS [114]. Several mutations in *CAV3* gene [115], which codes for caveolin 3 protein, have been recently described to cause LQT9. These alter the biophysical properties of sodium channel Nav1.5 in vitro, generating a phenotype similar to that observed in LQT3. LQT10 results from mutations in the *SCN4B* gene [116], which codes for the sodium channel β4-subunit.

Loss in the function of delayed rectifier potassium channels which fail to open to allow the efflux of K⁺ from the cell or gain in the function of the sodium, and rarely calcium channels, resulting in excessive ions to enter the cell, results in prolonged repolarization. This is reflected in prolonged QT interval in the ECG and causes electrical heterogeneity leading to early after depolarizations (EADs). EADs can facilitate a distinctive type of polymorphic ventricular tachycardia called Torsade des Pointes (TdP); this can cause syncope if self-limiting or it can degenerate into ventricular fibrillation and cardiac arrest.

The presentation of the disease is mainly monogenic; polygenic or composite varieties usually have a more severe phenotype [120]. Due to the autosomal dominant mode of transmission, 50% of the offspring will be affected, but there is variable penetrance (ranges from 25 to 90%) and expressivity [121].

The autosomal recessive long QT syndrome (Jervell and Lange-Nielsen disease) has been associated with homozygous or compound heterozygous mutations in 2 genes that encode for the slowly activating delayed rectifier potassium channel (*KCNQ1* and *KCNE1* [minK]) [122], that account for at least 80% of cases.

Molecular genetic studies developed over the last years have yielded important genotype–phenotype correlations, which have helped to guide the management approach. Swimming and exertion-induced cardiac events are more heavily associated with mutations in LQT1 gene [123]. In contrast, in LQT3 patients, cardiac events predominantly occur during sleep and rest, whereas auditory triggers and events occurring during the period after childbirth tend to be associated with LQT2 patients [124]. Exercise or mental stress more often triggers ventricular arrhythmias in LQT4 patients [112]. In LQT7, hypokalemia is more likely to trigger ventricular arrhythmias as well as periodic paralysis [113]. Thus, patients with these specific syndromes can be advised to avoid this form of activity.

Table 4
Long QT syndrome genes.

Type	Gene	Protein	Locus	Frequency (%)
Romano–Ward (autosomal dominant)				
SQTL1	<i>KCNQ1/KVLQT1</i>	IKs α subunit	11p15.5	30–35
SQTL2	<i>KCNH2/HERG</i>	IKr α subunit	7q35–36	25–30
SQTL3	<i>SCN5A</i>	INa α subunit	3p21p24	5–10
SQTL4	<i>ANKB</i>	Ankyrin β	4q25–q27	<1
SQTL5	<i>KCNE1/MinK</i>	IKs β subunit	21q22.1	<1
SQTL6	<i>KCNE2/MIRP1</i>	IKr β subunit	21q22.1	<1
SQTL7 (Andersen S.)	<i>KCNJ2</i>	K _{ir} 2.1 α subunit	17q23	<1
SQTL8 (Timothy S.)	<i>CACNA1C</i>	Ca _v 1.2 α subunit	12p13.3	<1
SQTL9	<i>CAV3</i>	Caveolin 3	3p25	<1
SQTL10	<i>SCN4B</i>	INa β4 subunit	11q23	<1
Jervell–Lange-Nielsen (autosomal recessive)				
S. JLN tipo I	<i>KCNQ1</i>	IKs α subunit	11p15.5	>90.5
S. JLN tipo II	<i>KCNE1</i>	IKs β subunit	21q22.1	<0.5

Despite the advances in this area, a genetic diagnosis cannot be established in 25–30% of patients [118,119]. Consequently, the lack of identification of a genetic defect cannot rule out the presence of the disease. Screening of family members of a genotyped proband allows presymptomatic diagnosis and the implementation of therapy when appropriate; it also allows the clinical status (affected versus nonaffected) to be defined in borderline cases. Of major relevance is the fact that identifying a genetic defect contributes to risk stratification [125], therapy selection, and prevention of factors that precipitate arrhythmias [123].

In Andersen syndrome, identification of the genetic defect is achieved in ~70% of clinically affected individuals by screening a single small gene. Genetic analysis carries clinically relevant implications such as the possibility to perform presymptomatic diagnosis, to identify silent carriers, and to encourage reproductive counselling. In Timothy syndrome, the most lethal form of the long QT syndrome, the advantage of genetic testing is hard to dispute. Identification of the mutation has a prognostic implication (adverse outcome), prenatal diagnosis can be performed, and screening of family members is important for reproductive counselling [77].

4.2. Brugada syndrome

The Brugada syndrome is a relatively new clinical entity associated with sudden cardiac death in young people. First described in 1992 [126], the syndrome is identified by a distinctive ECG pattern consisting of right bundle-branch block and coved ST-segment elevation in the anterior precordial leads (V1 through V3), a high incidence of ventricular fibrillation (VF) and sudden cardiac death. It is claimed to be responsible for up to 12% of all sudden deaths and approximately 20% of deaths occurring in patients with structurally normal hearts. Several population studies [127,128], searching for BS-ECG patterns in healthy adult populations have been performed worldwide, rendering the prevalence of the ECG pattern between 0.05% (Europe) and 0.4% (Japan). Vatta et al. [129] provided evidence that Asian cohorts, initially diagnosed with sudden unexpected nocturnal death syndrome (SUNDS), in fact represent BS patients, suggesting that the prevalence in the Southeast Asian population is even higher (1%).

This disease exhibits an autosomal dominant pattern of inheritance with variable and probably age-dependent expression. The first identified gene mutation (1998) was located on the SCN5A gene [130], encoding for the pore-forming α -subunit of the sodium channel. Screening for these mutations show they account for only about 25% of patients with Brugada syndrome [131,132]. This indicates there may be other mutations in the SCN5A gene and most likely mutations in multiple other genes. Currently, over 100 SCN5A mutations, primarily missense mutations, have been linked to the BS, and more mutations are being added to the list on a regular basis [133]; all of them create a decreased sodium current either by influencing the trafficking or the gating function of the channel.

The loss-of-function SCN5A mutations have also been described as being responsible for progressive conduction impairment in Lenègre disease [134] and inherited sick sinus syndrome [135]. It is also well documented that patients with BS, especially with an SCN5A mutation, show clinical signs of conduction slowing in the forms of PR, HV and QRS prolongation. Recently *SCN1B*, which encodes the function-modifying sodium channel β 1 subunit, has been implicated in Brugada syndrome and cardiac conduction disease [136].

In addition to the mutations of the sodium channel itself, mutations of genes that modulate sodium channel function are also associated with Brugada syndrome. For example, mutation of

the ankyrin-binding motif of Nav1.5 results in a loss of binding of Nav1.5 with its intracellular target chaperon ankyrin G, leading to Brugada syndrome [137]. Mutation of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like (GPD1-L) gene may affect trafficking of the sodium channel to the cell surface, which in turn reduces sodium current and causes Brugada syndrome [138].

Abnormalities of the sodium current are not the only genetic defects identified in Brugada syndrome. Antzelevitch et al. [139] have recently reported mutations in the gene encoding the L-type calcium channel (*CACNA1C*) or its β 2b subunit (*CACNB2b*) in Brugada syndrome patients with unusually short QT intervals. These findings indicate that, in addition to abnormalities of sodium currents, the reduced calcium current can also contribute to the development of Brugada syndrome.

Interesting genetic data have recently become available regarding the importance of single nucleotide polymorphisms, which might possibly explain the different clinical phenotypes or the intriguing differences between the incidences of BS in different geographic regions [140].

Genetic screening, currently not available, will be essential for the management of this disease because most of these people do not have symptoms. Because Brugada syndrome is a disease that manifests in adulthood with a very incomplete penetrance, and a high proportion of mutation carriers remain asymptomatic [141], the value of genetic analysis for reproductive counselling is less obvious than in other conditions associated with sudden death during childhood or adolescence. Genetic analysis is useful in non-penetrant mutation carriers and in family members of genotyped probands to detect early manifestation of the disease [77].

4.3. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia

CPVT is another heritable arrhythmia syndrome characterized by syncope, sudden death, polymorphic ventricular tachycardia (triggered by vigorous physical exertion or acute emotion usually in children and adolescents), a normal resting ECG, and the absence of structural cardiac disease [142]. The most typical arrhythmia of CPVT is bidirectional ventricular tachycardia presenting with an alternating QRS axis. Family history of one or multiple sudden cardiac deaths is evident in 30% of cases [143].

Two genetic variants of CPVT have been identified, one transmitted as an autosomal dominant trait caused by mutations in the RyR2 gene [144,145] and one recessive form caused by mutations in the cardiac-specific isoform of the calsequestrin gene (*CASQ2*) [146].

Perturbations due to mutations in the RyR2 gene encoding for the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel represent the most common genetic subtype [144,145,147]. RyR2, a large protein that forms the calcium release channel in the sarcoplasmic reticulum, is essential for regulation of excitation-contraction coupling and intracellular calcium levels. More than 60 RyR2 mutations have been reported so far. All RyR2 mutations identified in CPVT are mostly single-base-pair substitutions leading to the replacement of highly conserved amino acids. RyR2 mutations can be identified in approximately 70% of patients, with a mean penetrance of 80% [148]. Choi et al. [149] reported that CPVT should be considered in swimming-triggered cardiac events. CPVT is highly lethal with untreated mortality rates of 30–50% by age 40 [148]. Increasing evidences show that sudden cardiac death can be the first manifestation of the disease. Although the disease usually manifests in childhood, infants may also develop lethal arrhythmias as demonstrated by the evidence that mutations in RyR2 have been identified in young victims of sudden infant death syndrome [150]. Since approximately 20% of RyR2 mutation carriers may have no phenotype (incomplete penetrance) and sudden cardiac death can

be the first clinical presentation in CPVT, early genetic evaluation is very important for all family members of CPVT probands.

The autosomal recessive form of the disease has been linked to CASQ2, a gene that encodes for calsequestrin, a protein that serves as a major calcium-binding protein in the terminal cisternae of the sarcoplasmic reticulum. Calsequestrin is bound to the ryanodine receptor and participates in the control of excitation–contraction coupling. To date, a limited number of CASQ2-genotyped patients have been reported. Recently, the first CPVT patient carrier of two distinct CASQ2 mutations has been reported, thus demonstrating that the compound heterozygous mutations lead to catecholaminergic VT phenotype [151]. To date, only 7% of CPVT probands harbor CASQ2 mutations, suggesting that this is a relatively uncommon variant of CPVT [148].

A disease-causing mutation in RyR2 or CASQ2 can be identified in 50–70% of CPVT patients; therefore, it is likely that other CPVT genes exist [147,148].

The clinical diagnosis of CPVT is rather elusive because affected individuals show an unremarkable ECG and lack structural abnormalities of the heart, so genetic analysis often is very helpful for diagnosing the disease. This is especially important because, if left untreated, CPVT is a highly malignant disease, but prognosis improves substantially once the disease is correctly identified and therapy is implemented. Presymptomatic diagnosis, diagnosis in silent carriers, and reproductive counselling are additional important benefits of successful genetic analysis [77]. Overall, the indication for DNA screening in CPVT is high.

4.4. Short QT syndrome

The short QT syndrome has been recognized recently as a separate clinical entity [152,153]. The characteristic ECG finding is the persistently short QT interval ($QTc < 300$ ms), with tall, symmetric, peaked T waves. The clinical picture consists of sudden death, syncope, palpitations, and malignant arrhythmias. Most patients have a family history of sudden death. Autosomal dominant inheritance was suggested. The syndrome has been linked to gain-of-function mutations in KCNH2 (HERG, SQT1) [154], KCNQ1 (KvLQT1, SQT2) [155], and KCNJ2 (Kir2.1, SQT3) [156], causing an increase in the intensity of *I_{Kr}*, *I_{Ks}*, and *I_{K1}*, respectively. Interestingly, another “gain-of-channel-function” type mutation of the same KCNQ1 gene has been associated with familial atrial fibrillation without QT shortening [157].

Recently, a new clinical entity that combines Brugada and Short QT phenotypes caused by loss-of-function mutations in the α_1 - and β -subunits of the L-type cardiac calcium channels has been described [139].

5. The pathologist responsibilities in the diagnosis and prevention of sudden death

Obviously, the pathologist has a responsibility to accurately record data to identify the cause of death with a reasonable degree of credibility. Also, in each case of sudden death, another important duty of the forensic pathologist is to inform the family of all autopsy results [158]. Another unusual role of the forensic autopsy has been emphasized: it can also be employed as a tool of preventive medicine [159]. If the death is due to a familial condition such as HCM or the long QT syndrome, other family members will be at risk and can benefit from preventive strategies. In several cases, in fact, sudden death can be the first and unique symptom of genetic diseases, and in those cases it undergoes the only evaluation of the pathologist. As a consequence, pathologists who see most of the index cases have a great responsibility. A precise pathological diagnosis of the

underlying heart disease, which also takes advantage of advanced molecular biology techniques, will be the source of vital information for relatives and clinicians. The concept of a “molecular autopsy” is currently a major focus of research studies in this area [16].

Although the investigation of mutations in genetically heterogeneous disorders is not an easy task, state-of-the-art genotyping technologies are offering new possibilities to simultaneously analyze hundreds of mutations from different genes and a new generation of solid phase sequencing strategies is allowing high throughput sequencing of candidate genes.

The variety of chemistries and platforms [160] allows for different strategic approaches. One of the most interesting is the use of DNA chip technologies both with Affymetrix or conventional DNA arrays, especially using MALDITOF-MS [161].

It is very important to pursue all available avenues to determine the exact cause of death, including genetic testing. The post-mortem diagnosis of cardiomyopathies is very important because the family of the deceased will need counselling and the first-degree relatives may undergo a possible screening to prevent other sudden deaths. In case of sudden death without significant morphological anomalies, searching for mutations linked to functional cardiac pathology is the best approach to explain such sudden deaths and subsequently benefit those left behind.

Chugh et al. [3] recently showed the utility of an in depth investigation in cases with a negative autopsy. Recent studies [162,163] emphasize the importance of screening families for genetic conditions in sudden cardiac death cases. The occurrence of sudden death with a normal heart should therefore prompt referral of close relatives to a specialist cardiologist for genetic screening.

The first report [164] of a molecular diagnosis of an arrhythmia disorder through the use of a molecular autopsy occurred in 1999, with the description of a successful identification of inherited long QT syndrome in a 19-year-old girl who died after a near-drowning. First of all, this result has potentially great importance for forensic science by providing a plausible mechanism for cardiac arrest in the setting of an otherwise structurally normal heart. Moreover, thanks to this molecular biology finding, the presence of the disease-causing mutation was traced back to the woman's maternal grandfather, providing the means for definite genetic analysis for at least 60 extended relatives and the initiation of treatment and prevention strategies for those carrying the familial mutation. This case also illustrates that molecular autopsy may potentially provide the pathogenic basis for SUD and establish not only the cause but also the manner of death.

Since this initial report, other case reports [159,165–167] on the post-mortem molecular diagnosis of inherited arrhythmia syndromes through the use of a molecular autopsy have been presented. Recently, a molecular autopsy series of SUD identified pathogenic mutations on long QT and CPVT-associated genes in over one third of cases [167]. Similar post-mortem cardiac channel genetic testing in a large population-based cohort of sudden infant death syndrome has elucidated mutations in 5–10% of cases [97,168,169].

At present, when necropsy in modern medicine is questioned [170], the data provided in this study emphasize its importance and central role in helping families come to terms with death in a previously healthy relative. Detailed and precise cardiac findings will be important for these families in terms of health screening, genetic counselling, prevention and treatment of subjects at risk. In order to develop these strategies, the incidence, causes and circumstances surrounding sudden death must be better known and are mainly provided by forensic pathology.

Acknowledgements

This work was supported by Grants from Instituto de Salud Carlos III (PI060165) and Xunta de Galicia (PGDIT06BTF).

References

- [1] R. Virmani, A.P. Burke, A. Farb, Sudden cardiac death, *Cardiovasc. Pathol.* 10 (2001) 275–282.
- [2] A. Bayés de Luna, A. Bayés-Genís, J. Guindo, Soldevila Muerte súbita cardíaca, in: *Timely Topics in Medicine*, 1997.
- [3] S.S. Chugh, K.L. Kelly, J.L. Titus, Sudden cardiac death with apparently normal hearts, *Circulation* 102 (2000) 649–654.
- [4] R.R. Liberson, Sudden death from cardiac causes in children and young adults, *N. Engl. J. Med.* 334 (1996) 1039–1044.
- [5] S.D. Cohn, B.A. Sampson, The negative autopsy: sudden cardiac death or other? *Cardiovasc. Pathol.* 10 (2001) 219–222.
- [6] B.J. Maron, J. Shirani, L.C. Poliac, R. Mathenge, W.C. Roberts, F.O. Mueller, Sudden death in young competitive athletes. Clinical, demographic, and pathological profiles, *JAMA* 276 (1996) 199–204.
- [7] D. Corrado, C. Basso, G. Thiene, Sudden cardiac death in young people with apparently normal heart, *Cardiovasc. Res.* 50 (2001) 399–408.
- [8] P. Puranik, C.K. Chow, J.A. Dufou, M.J. Kilborn, M.A. McGuire, Sudden death in the young, *Heart Rhythm* 2 (2005) 1277–1282.
- [9] B. Morentin, M.P. Suarez-Mier, B. Aguilera, Sudden unexplained death among persons 1–35 years old, *Forensic Sci. Int.* 135 (2003) 213–217.
- [10] M.J. Davies, A. Thomas, Thrombosis and acute coronary artery lesions in sudden cardiac ischemic death, *N. Engl. J. Med.* 310 (1984) 1137–1140.
- [11] Y. Drory, Y. Turetz, Y. Hiss, B. Lev, E.Z. Fisman, A. Pines, M.R. Kramer, Sudden unexpected death in persons less than 40 years of age, *Am. J. Cardiol.* 68 (1991) 1388–1392.
- [12] D.R. Neusspiel, L.H. Kuller, Sudden and unexpected natural death in childhood and adolescence, *JAMA* 254 (1985) 1321–1325.
- [13] O. Topaz, J.E. Edwards, Pathologic features of sudden death in children, adolescents, and young adults, *Chest* 87 (1985) 476–482.
- [14] C. Basso, F. Calabrese, D. Corrado, G. Thiene, Postmortem diagnosis in sudden cardiac death victims: macroscopic, microscopic and molecular findings, *Cardiovasc. Res.* 50 (2001) 290–300.
- [15] J. Ingles, C. Semsarian, Sudden cardiac death in the young, *Int. Med. J.* 37 (2007) 32–37.
- [16] D.J. Tester, J. Ackerman, The role of molecular autopsy in unexplained sudden cardiac death, *Curr. Opin. Cardiol.* 21 (2006) 166–172.
- [17] G. Loin de la Grandmaison, Is there progress in the autopsy diagnosis of the sudden unexplained death in adults? *Forensic Sci. Int.* 156 (2006) 138–144.
- [18] P. Richardson, W. McKenna, M. Bristow, B. Maisch, B. Mautner, J. O'Connell, E. Olsen, G. Thiene, J. Goodwin, I. Gyarras, I. Martin, P. Nordet, Report of the 1995 World Health Organization: "International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and Classification of Cardiomyopathies", *Circulation* 93 (1996) 841–842.
- [19] B.J. Maron, W.J. McKenna, G.K. Danielson, L.J. Kappenberger, H.J. Kuhn, C.E. Seidman, P.M. Shah, W.H. Spencer Jr., P. Spirito, J. Ten Cate, E.D. Wigle, American College of Cardiology/European Society of Cardiology clinical expert consensus document on hypertrophic cardiomyopathy. A report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines, *J. Am. Coll. Cardiol.* 42 (2003) 1687–1713.
- [20] B.J. Maron, J.A. Towbin, G. Thiene, C. Antzelevitch, D. Corrado, D. Arnett, A.J. Moss, C.E. Seidman, J.B. Young, Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee: Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention, *Circulation* 113 (2006) 1807–1816.
- [21] P. Elliott, B. Andersson, E. Arbustini, Z. Bilinska, F. Cecchi, P. Charron, O. Dubourg, U. Kühn, B. Maisch, W.J. McKenna, L. Monserrat, S. Pankuweit, C. Rapezzi, P. Seferovic, L. Tavazzi, A. Keren, Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on myocardial and pericardial diseases, *Eur. Heart J.* 29 (2008) 270–276.
- [22] B.J. Maron, J.M. Gardin, J.M. Flack, S.S. Gidding, T.T. Kurossaki, D.E. Bild, Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA study, *Circulation* 92 (1995) 785–789.
- [23] B.J. Maron, Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review, *JAMA* 287 (2002) 1308–1320.
- [24] M. Bríccó, C. Allegue, P. Sánchez-Diz, R. Gil, A. Blanco-Verea, I. Quintela, M. Torres, A. Carracedo, New developments on the genetics of Sudden Cardiac Death (SCD), *Forensic Sci. Int.: Genetics*, in press.
- [25] W.J. McKenna, A.J. Camm, Sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. Assessment of patients at high risk, *Circulation* 80 (1989) 1489–1492.
- [26] P.M. Shah, A.G. Adelman, E.D. Wigle, F.L. Gobel, H.B. Burchell, T. Hardarson, R. Curiel, C. de la Calzada, C.M. Oakley, J.F. Goodwin, The natural (and unnatural) history of hypertrophic obstructive cardiomyopathy. A multicenter study, *Circ. Res.* 35 (Suppl. II) (1974) 179–195.
- [27] W. McKenna, J. Deanfield, Hypertrophic cardiomyopathy: an important cause of sudden death, *Arch. Dis. Child.* 59 (1984) 971–975.
- [28] M.J. Kofflard, D.J. Waldstein, J. Vos, F.J. ten Cate, Prognosis in hypertrophic cardiomyopathy observed in a large clinic population, *Am. J. Cardiol.* 72 (1993) 939–943.
- [29] C.R. Cannan, G.S. Reeder, K.R. Bailey, L.J. Melton III, B.J. Gersh, Natural history of hypertrophic cardiomyopathy: a population based study, 1976 through 1990, *Circulation* 92 (1995) 2488–2495.
- [30] M.J. Davies, W.J. McKenna, Hypertrophic cardiomyopathy-pathology and pathogenesis, *Histopathology* 26 (1995) 493–500.
- [31] E.D. Wigle, Cardiomyopathy, The diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy, *Heart* 86 (2001) 709–714.
- [32] A.A. Geisterfer-Lowrance, S. Kass, G. Tanigawa, H.P. Vosberg, W. McKenna, C.E. Seidman, J.G. Seidman, A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation, *Cell* 62 (1990) 999–1006.
- [33] K. Poetter, H. Jiang, S. Hassanzadeh, S.R. Master, A. Chang, M.C. Dalakas, I. Rayment, J.R. Sellers, L. Fananapazir, N.D. Epstein, Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle, *Nat. Genet.* 13 (1996) 63–69.
- [34] H. Watkins, D. Conner, L. Thierfelder, J.A. Jarcho, C. MacRae, W.J. McKenna, B.J. Maron, J.G. Seidman, C.E. Seidman, Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy, *Nat. Genet.* 11 (1995) 434–437.
- [35] L. Thierfelder, H. Watkins, C. MacRae, R. Lamas, W. McKenna, H.P. Vosberg, J.G. Seidman, C.E. Seidman, Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere, *Cell* 77 (1994) 701–712.
- [36] A. Kimura, H. Harada, J.E. Park, H. Nishi, M. Satoh, M. Takahashi, S. Hiroi, T. Sasaoka, N. Ohbuchi, T. Nakamura, T. Koyanagi, N.D. Epstein, Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle, *Nat. Genet.* 13 (1996) 63–69.
- [37] T.M. Olson, M.L. Karst, F.G. Whitby, D.J. Driscoll, Myosin light chain mutation causes autosomal recessive cardiomyopathy with mid-cavitary hypertrophy and restrictive physiology, *Circulation* 105 (2002) 2337–2340.
- [38] J. Mogensen, J.C. Klausen, A.K. Pedersen, H. Egeblad, P. Bross, T.A. Kruse, N. Gregersen, P.S. Hansen, U. Baandrup, A.D. Borglum, Alpha-cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy, *J. Clin. Invest.* 103 (1999) R39–R43.
- [39] M. Satoh, M. Takahashi, T. Sakamoto, M. Hiroe, F. Marumo, A. Kimura, Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262 (1999) 411–417.
- [40] H. Niimura, L.L. Bachinski, S. Sangwatanaroj, H. Watkins, A.E. Chudley, W. McKenna, A. Kristinsson, R. Roberts, M. Sole, B.J. Maron, J.G. Seidman, C.E. Seidman, Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy, *N. Engl. J. Med.* 338 (1998) 1248–1257.
- [41] B. Hoffmann, H. Schmidt-Traub, A. Perrot, K.J. Osterziel, J. Gessner, First mutation in cardiac troponin C, L29Q, in a patient with hypertrophic cardiomyopathy, *Hum. Mutat.* 17 (6) (2001) 524.
- [42] P. Richard, P. Charron, L. Carrier, C. Ledeuil, T. Cheav, C. Pichereau, A. Benaiche, R. Isnard, O. Dubourg, M. Burban, J.P. Gueffet, A. Millaire, M. Desnos, K. Schwartz, B. Hainque, M. Komajda, EUROGENE Heart Failure Project. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy, *Circulation* 107 (2003) 2227–2232.
- [43] S.L. Van Driest, V.C. Vasile, S.R. Ommen, M.L. Will, A.J. Tajik, B.J. Gersh, M.J. Ackerman, Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy, *J. Am. Coll. Cardiol.* 44 (2004) 1903–1910.
- [44] S.L. Van Driest, M.A. Jaeger, S.R. Ommen, M.L. Will, B.J. Gersh, A.J. Tajik, M.J. Ackerman, Comprehensive analysis of the beta-myosin heavy chain gene in 389 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy, *J. Am. Coll. Cardiol.* 44 (2004) 602–610.
- [45] S. Morner, P. Richard, E. Kazzam, U. Hellman, B. Hainque, K. Schwartz, A. Waldenström, Identification of the genotypes causing hypertrophic cardiomyopathy in northern Sweden, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35 (2003) 841–849.
- [46] J. Erdmann, S. Daehmlow, S. Wischke, M. Seryuwa, U. Werner, J. Raible, N. Tanis, S. Dyachenko, M. Hummel, R. Hetzer, V. Regitz-Zagrosek, Mutation spectrum in a large cohort of unrelated consecutive patients with hypertrophic cardiomyopathy, *Clin. Genet.* 64 (2003) 339–349.
- [47] H. Watkins, L. Thierfelder, D.S. Hwang, W. McKenna, J.G. Seidman, C.E. Seidman, Sporadic hypertrophic cardiomyopathy due to de novo myosin mutations, *J. Clin. Invest.* 90 (1992) 1666–1671.
- [48] H. Watkins, R. Anan, D.A. Coviello, P. Spirito, J.G. Seidman, C.E. Seidman, A de novo mutation in alpha-tropomyosin that causes hypertrophic cardiomyopathy, *Circulation* 91 (1995) 2302–2305.
- [49] P. Richard, R. Isnard, L. Carrier, O. Dubourg, Y. Donatien, B. Mathieu, G. Bonne, F. Gary, P. Charron, M. Hagege, M. Komajda, K. Schwartz, B. Hainque, Double heterozygosity for mutations in the beta-myosin heavy chain and in the cardiac myosin binding protein C genes in a family with hypertrophic cardiomyopathy, *J. Med. Genet.* 36 (1999) 542–545.
- [50] J. Ingles, A. Doolan, C. Chiu, J. Seidman, C. Seidman, C. Semsarian, Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counselling, *J. Med. Genet.* 42 (2005) e59.

Estudio genético de la muerte súbita cardíaca: Miocardiopatía Hipertrófica Familiar y Síndrome de QT Largo.

10

M.S. Rodríguez-Calvo et al. / Forensic Science International 182 (2008) 1–12

- [51] H. Watkins, A. Rosenzweig, D.S. Hwang, T. Levi, W. McKenna, C.E. Seidman, J.G. Seidman, Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy, *N. Engl. J. Med.* 326 (1992) 1108–1114.
- [52] R. Anan, G. Greve, L. Thierfelder, H. Watkins, W.J. McKenna, S. Solomon, C. Vecchio, H. Shono, S. Nakao, H. Tanaka, A. Mares Jr., J.A. Towbin, P. Spirito, R. Roberts, J.G. Seidman, C.E. Seidman, Prognostic implications of novel beta cardiac myosin heavy chain gene mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy, *J. Clin. Invest.* 93 (1994) 280–285.
- [53] D.A. Coviello, B.J. Maron, P. Spirito, H. Watkins, F.J. Vosberg, L. Thierfelder, F.J. Schoen, J.G. Seidman, C.E. Seidman, Clinical features of hypertrophic cardiomyopathy caused by mutation of a 'hot spot' in the alpha-tropomyosin gene, *J. Am. Coll. Cardiol.* 29 (1997) 635–640.
- [54] J.C. Moolman, V.A. Corfield, B. Posen, K. Ngumbela, C. Seidman, P.A. Brink, H. Watkins, Sudden death due to troponin T mutations, *J. Am. Coll. Cardiol.* 29 (1997) 549–555.
- [55] A. Varnava, C. Baboonian, F. Davison, L. de Cruz, P.M. Elliott, M.J. Davies, W.J. McKenna, A new mutation of the cardiac troponin T gene causing familial hypertrophic cardiomyopathy without left ventricular hypertrophy, *Heart* 82 (1999) 621–624.
- [56] P.M. Elliott, J. Poloniecki, S. Dickie, S. Sharma, L. Monserrat, A. Varnava, N.G. Mahon, W.J. McKenna, Sudden death in hypertrophic cardiomyopathy: identification of high risk patients, *J. Am. Coll. Cardiol.* 36 (2000) 2212–2218.
- [57] J.G. Seidman, C. Seidman, The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms, *Cell* 104 (2001) 557–567.
- [58] H. Niimura, K.K. Patton, W.J. McKenna, J. Soultis, B.J. Maron, J.G. Seidman, C.E. Seidman, Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy of the elderly, *Circulation* 105 (2002) 446–451.
- [59] M.J. Ackerman, S.L. Van Driest, S.R. Ommen, M.L. Will, R.A. Nishimura, A.J. Tajik, B.J. Gersh, Prevalence and age-dependence of malignant mutations in the beta-myosin heavy chain and troponin T gene in hypertrophic cardiomyopathy: a comprehensive outpatient perspective, *J. Am. Coll. Cardiol.* 39 (2002) 2042–2048.
- [60] S.L. Van Driest, B.J. Maron, M.J. Ackerman, From malignant mutations to malignant domains: the continuing search for prognostic significance in the mutant genes causing hypertrophic cardiomyopathy [Comment], *Heart* 90 (2004) 7–8.
- [61] S.V. Van Driest, M.J. Ackerman, S.R. Ommen, R. Shakur, M.L. Will, R.A. Nishimura, A.J. Tajik, B.J. Gersh, Prevalence and severity of 'benign' mutations in the beta myosin heavy chain, cardiac troponin-T, and alpha tropomyosin genes in hypertrophic cardiomyopathy, *Circulation* 106 (2002) 3085–3090.
- [62] S.L. Van Driest, V.C. Vassile, S.R. Ommen, M.L. Will, A.J. Tajik, B.J. Gersh, M.J. Ackerman, Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy, *J. Am. Coll. Cardiol.* 44 (2004) 1903–1910.
- [63] P. Richard, E. Villard, P. Charron, R. Isnard, The genetic bases of cardiomyopathies, *J. Am. Coll. Cardiol.* 48 (2006) A79–89.
- [64] J.M. Bos, S.R. Ommen, M.J. Ackerman, Genetics of hypertrophic cardiomyopathy: one, two, or more diseases? *Curr. Opin. Cardiol.* 22 (2007) 193–199.
- [65] C. Geier, A. Perrot, C. Ozcelik, P. Binnet, D. Counsell, K. Hoffmann, B. Pilz, Y. Martiniak, K. Gehrmlich, P.F. van der Ven, D.O. Fürst, A. Vornwald, E. von Hohenberg, P. Nürnberg, T. Scheffold, R. Dietz, K.J. Osterziel, Mutations in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy, *Circulation* 107 (2003) 1390–1395.
- [66] T. Hayashi, T. Arimura, M. Itoh-Satoh, K. Ueda, S. Hohda, N. Inagaki, M. Takahashi, H. Hori, M. Yasunami, H. Nishi, Y. Koga, H. Nakamura, M. Matsuzaki, B.Y. Choi, S.W. Bae, C.W. You, K.H. Han, J.E. Park, R. Knöll, M. Hoshijima, K.R. Chien, A. Kimura, T. Cap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy, *J. Am. Coll. Cardiol.* 44 (2004) 2192–2201.
- [67] J.L. Theis, J.M. Bos, V.B. Bartleson, M.L. Will, J. Binder, J.A. Towbin, B.J. Gersh, S.R. Ommen, M.J. Ackerman, Echocardiographic-determined septal morphology in Z-disc hypertrophic cardiomyopathy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351 (2006) 896–902.
- [68] V.C. Vassile, M.L. Will, S.R. Ommen, W.D. Edwards, T.M. Olson, M.J. Ackerman, Identification of a metavanilin missense mutation, R975W, associated with both hypertrophic and dilated cardiomyopathy, *Mol. Genet. Metab.* 87 (2006) 169–174.
- [69] V.C. Vassile, S.R. Ommen, W.D. Edwards, M.J. Ackerman, A missense mutation in a ubiquitously expressed protein, vinculin, confers susceptibility to hypertrophic cardiomyopathy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345 (2006) 998–1003.
- [70] S. Minamisawa, Y. Sato, Y. Tatsuguchi, T. Fujino, S. Imamura, Y. Uetsuka, M. Nakazawa, R. Matsuko, Mutation of the phospholamban promoter associated with hypertrophic cardiomyopathy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304 (2003) 1–4.
- [71] K. Haghighi, F. Kolokathis, A.O. Gramolini, J.R. Waggoner, L. Pater, R.A. Lynch, G.C. Fan, D. Tsiafras, R.R. Parekh, G.W. Dorn II, D.H. MacLennan, D.T. Kremastinos, E.G. Kranias, A mutation in the human phospholamban gene, deleting arginine 14, results in lethal, hereditary cardiomyopathy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 1388–1393.
- [72] N. Fujino, H. Ino, K. Hayashi, K. Uchiyama, M. Nagata, T. Konno, H. Katoh, Y. Sakamoto, T. Tsubokawa, K. Ohsato, S. Mizuno, M. Yamagishi, A novel missense mutation in cardiac ryanodine receptor gene as a possible cause of hypertrophic cardiomyopathy: evidence from familial analysis [Abstract], *Circulation* 114 (2006) 1165.
- [73] A.P. Landstrom, N. Weisleder, K.B. Batalden, J.M. Bos, D.J. Tester, S.R. Ommen, X.H. Wehrens, W.C. Claycomb, J.K. Ko, M. Hwang, Z. Pan, J. Ma, M.J. Ackerman, Mutations in JP2-encoded junctophilin-2 associated with hypertrophic cardiomyopathy in humans, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 42 (2007) 1026–1035.
- [74] M. Arad, B.J. Maron, J.M. Gorham, W.H. Johnson Jr., J.P. Saul, A.R. Perez-Atayde, P. Spirito, G.B. Wright, R.J. Kanter, C.E. Seidman, J.G. Seidman, Glycogen storage diseases presenting as hypertrophic cardiomyopathy, *N. Engl. J. Med.* 352 (2005) 362–372.
- [75] S.L. Van Driest, O. Gakh, S.R. Ommen, G. Isaya, M.J. Ackerman, Molecular and functional characterization of a human frataxin mutation found in hypertrophic cardiomyopathy, *Mol. Genet. Metab.* 85 (2005) 280–285.
- [76] S. Nakao, T. Takenaka, M. Maeda, C. Kodama, A. Tanaka, M. Tahara, A. Yoshida, M. Kuriyama, H. Hayashibe, H. Sakuraba, H. Tanaka, An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy, *N. Engl. J. Med.* 333 (1995) 288–293.
- [77] S.G. Priori, C. Napolitano, Role of genetic analyses in cardiology. Part I: Mendelian diseases: cardiac channelopathies, *Circulation* 113 (2006) 1130–1135.
- [78] G. Thiene, A. Nava, D. Corrado, L. Rossi, N. Pennelli, Right ventricular cardiomyopathy and sudden death in young people, *N. Engl. J. Med.* 318 (1988) 129–133.
- [79] P. Gallo, G. D'Amati, F. Pelliccia, Pathologic evidence of extensive left ventricular involvement in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *Hum. Pathol.* 23 (1992) 948–952.
- [80] G. McKay, N. Protonotarios, A. Crosby, A. Tsatsopoulou, A. Anastakis, A. Conar, M. Norman, C. Baboonian, S. Jeffery, W.J. McKenna, Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease), *Lancet* 355 (2000) 2119–2124.
- [81] A. Rampazzo, A. Nava, S. Malacrida, G. Boffagna, B. Bauce, V. Rossi, R. Zimbelli, B. Simonati, C. Basso, G. Thiene, J.A. Towbin, G.A. Danieli, Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *Am. J. Hum. Genet.* 71 (2002) 1200–1206.
- [82] B. Gerull, A. Heuser, T. Wichter, M. Paul, C.T. Basson, D.A. McDermott, B.B. Lerman, S.M. Markowitz, P.T. Ellinor, C.A. MacRae, S. Peters, K.S. Grossmann, J. Drenckhahn, B. Michely, S. Sasse-Klaassen, W. Birchmeier, R. Dietz, G. Breithardt, E. Schulze-Bahr, L. Thierfelder, Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *Nat. Genet.* 36 (2004) 1162–1164.
- [83] K. Pilichou, A. Nava, C. Basso, G. Boffagna, B. Bauce, A. Lorenzon, G. Frigo, A. Vettori, M. Valente, J. Towbin, G. Thiene, G.A. Danieli, A. Rampazzo, Mutations in desmoglein-2 gene are associated to arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *Circulation* 113 (2006) 1171–1179.
- [84] P. Syrris, D. Ward, A. Evans, A. Asimaki, E. Gadjbakch, S. Sen-Chowdhry, W.J. McKenna, Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in the desmosomal gene desmocolin-2, *Am. J. Hum. Genet.* 79 (2006) 978–984.
- [85] A. Rampazzo, A. Nava, G.A. Danieli, G. Buja, L. Daliento, G. Fasoli, R. Scognamiglio, D. Corrado, G. Thiene, The gene for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy maps to chromosome 14q23-q24, *Hum. Mol. Genet.* 3 (1994) 959–962.
- [86] E.E. Norgett, S.J. Hatsell, L. Carvajal-Huerta, J.C. Cabezas, J. Connam, P.E. Purkis, N. Whitlock, I.M. Leigh, H.P. Stevens, D.J. Kelsell, Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma, *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000) 2761–2766.
- [87] N. Tiso, D.A. Stephan, A. Nava, A. Bagatrin, J.M. Devaney, F. Stanchi, G. Larderet, B. Brahmabhatt, K. Brown, B. Bauce, M. Muriago, C. Basso, G. Thiene, G.A. Danieli, A. Rampazzo, Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2), *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001) 189–194.
- [88] G. Boffagna, G. Occhi, A. Nava, L. Vitiello, A. Ditadi, C. Basso, B. Bauce, G. Carraro, G. Thiene, J.A. Towbin, G.A. Danieli, A. Rampazzo, Regulatory mutations in transforming growth factor-beta 3 gene cause arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 1, *Cardiovasc. Res.* 65 (2005) 366–373.
- [89] S. Sen-Chowdhry, P. Syrris, D. Ward, A. Asimaki, E. Sevdalis, W.J. McKenna, Clinical and genetic characterization of families with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy provides novel insights into patterns of disease expression, *Circulation* 115 (2007) 1710–1720.
- [90] D. Corrado, G. Thiene, Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: clinical impact of molecular genetic studies, *Circulation* 113 (2006) 1634–1637.
- [91] D. Dalal, L.H. Molin, J. Piccini, C. Tichnell, C. James, C. Bomma, K. Prakasa, J.A. Towbin, F.I. Marcus, P.J. Spevak, D.A. Bluemke, T. Abraham, S.D. Russell, H. Calkins, D.P. Judge, Clinical features of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in plakophilin-2, *Circulation* 113 (2006) 1641–1649.
- [92] J.P. van Tintelen, M.M. Entius, Z.A. Bhruvian, R. Jongbloed, A.C.P. Wiegand, A.A.M. Wilde, J. van der Smagt, L.G. Boven, M.M.A.M. Mennens, I.M. van Langen, R.M.W. Hofstra, L.C. Otterspoor, P.A.F.M. Doevendans, L.-M. Rodriguez, I.C. van Gelder, R.N.W. Hauer, Plakophilin-2 mutations are the major determinant of familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy, *Circulation* 113 (2006) 1650–1658.
- [93] P. Syrris, D. Ward, A. Asimaki, S. Sen-Chowdhry, H.Y. Ebrahim, A. Evans, N. Hitomi, M. Norman, A. Pantazis, A.L. Shaw, P.M. Elliott, W.J. McKenna, Clinical expression of plakophilin-2 mutations in familial arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *Circulation* 113 (2006) 356–364.
- [94] J.P. van Tintelen, R.M. Hofstra, A.C. Wiesel, M.P. van den Berg, R.N. Hauer, J.D. Jongbloed, Molecular genetics of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: emerging horizon? *Curr. Opin. Cardiol.* 22 (3) (2007) 185–192.

- [95] S. Sen-Chowdhry, P. Syrris, W.J. McKenna, Role of Genetic Analysis in the Management of Patients with Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/ Cardiomyopathy, *J. Am. Coll. Cardiol.* 50 (2007) 1813–1821.
- [96] E. Marban, Cardiac channelopathies, *Nature* 415 (2002) 213–218.
- [97] D.J. Tester, M.J. Ackerman, Sudden infant death syndrome: how significant are the cardiac channelopathies? *Cardiovasc. Res.* 67 (2005) 388–396.
- [98] E.F. Wever, E.O. Robles de Medina, Sudden death in patients without structural heart disease, *J. Am. Coll. Cardiol.* 43 (2004) 1137–1144.
- [99] M.J. Ackerman, Cardiac channelopathies: it's in the genes, *Nat. Med.* 10 (2004) 463–464.
- [100] M.T. Keating, M.C. Sanguinetti, Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias, *Cell* 104 (2001) 569–580.
- [101] M.J. Ackerman, D.E. Clapham, Ion channels—basic science and clinical disease, *N. Engl. J. Med.* 336 (1997) 1575–1586.
- [102] P.J. Schwartz, The congenital long QT syndromes from genotype to phenotype: clinical implications, *J. Intern. Med.* 259 (2006) 39–47.
- [103] A. Jervell, F. Lang-Nielsen, Congenital deaf mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death, *Am. Heart J.* 54 (1957) 59–65.
- [104] C. Romano, G. Gemme, R. Pongiglione, Aritmie cardiache rare in eta pediatrica, *Clin. Pediatr.* 45 (1963) 656–683.
- [105] O.C. Ward, A new familial cardiac syndrome in children, *J. Indian Med. Assoc.* 54 (1964) 103–106.
- [106] M. Keating, C. Dunn, A. Atkinson, K. Timothy, G.M. Vincent, M. Leppert, Linkage of a cardiac arrhythmia, the long QT syndrome, and the Harvey ras-1 gene, *Science* 252 (1991) 704–706.
- [107] Q. Wang, M.E. Curran, I. Splawski, T.C. Burn, J.M. Millholland, T.J. Van Raay, J. Shen, K.W. Timothy, G.M. Vincent, T. de Jager, P.J. Schwartz, J.A. Towbin, A.J. Moss, D.L. Atkinson, G.M. Landes, T.D. Connors, M.T. Keating, Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias, *Nat. Genet.* 12 (1996) 17–23.
- [108] M.E. Curran, I. Splawski, K.W. Timothy, G.M. Vincent, E.D. Green, M.T. Keating, A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome, *Cell* 80 (1995) 795–803.
- [109] Q. Wang, J. Shen, I. Splawski, D. Atkinson, Z. Li, J.L. Robinson, A.J. Moss, J.A. Towbin, M.T. Keating, SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome, *Cell* 80 (1995) 805–811.
- [110] I. Splawski, M. Tristani-Firouzi, M.H. Lehmann, M.C. Sanguinetti, M.T. Keating, Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function, *Nat. Genet.* 17 (1997) 338–340.
- [111] G.W. Abbott, F. Sesti, I. Splawski, M.E. Buck, M.H. Lehmann, K.W. Timothy, M.T. Keating, S.A. Goldstein, MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia, *Cell* 97 (1999) 175–187.
- [112] P.J. Mohler, J.J. Schott, A.O. Gramolini, K.W. Dilly, S. Guatimosim, W.H. duBell, L.S. Song, K. Haurouge, F. Kyndt, M.E. Ali, T.B. Rogers, W.J. Lederer, D. Escande, H. Le Marec, V. Bennett, Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death, *Nature* 421 (2003) 634–639.
- [113] N.M. Plaster, R. Tawil, M. Tristani-Firouzi, S. Canun, S. Bendahhou, A. Tsunoda, M.R. Donaldson, S.T. Iannaccone, E. Brunt, R. Barohn, J. Clark, F. Deymeier, A.L. George Jr., F.A. Fish, A. Hahn, A. Nitu, C. Ozdemir, P. Sertdaroglu, S.H. Subramony, G. Wolfe, Y.H. Fu, L.J. Práček, Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome, *Cell* 105 (2001) 511–519.
- [114] I. Splawski, K.W. Timothy, L.M. Sharpe, N. Decher, P. Kumar, R. Bloise, C. Napolitano, P.J. Schwartz, R.M. Joseph, K. Condouris, H. Tager-Flusberg, S.G. Priori, M.C. Sanguinetti, M.T. Keating, Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism, *Cell* 119 (2004) 19–31.
- [115] M. Vatta, M. Ackerman, B. Ye, J. Makielski, E. Ughanze, E.W. Taylor, D.J. Tester, R.C. Balijepalli, J.D. Foell, Z. Li, T.J. Kamp, J.A. Towbin, Mutant Caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long QT syndrome, *Circulation* 114 (20) (2006) 2104–2112.
- [116] A. Medeiros, T. Kaku, D.J. Tester, P. Iturralde, A. Itty, B. Ye, J. Valdivia, S. Makielski, S. Quintero, T. Luna, M.J. Ackerman, Sodium channel B4 subunit mutation causes congenital long QT syndrome, *Heart Rhythm* 3 (2006) S34.
- [117] I. Splawski, J. Shen, K.W. Timothy, M.H. Lehmann, S. Priori, J.L. Robinson, A.J. Moss, P.J. Schwartz, J.A. Towbin, G.M. Vincent, M.T. Keating, Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes: KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2, *Circulation* 102 (2000) 1178–1185.
- [118] D.J. Tester, M.L. Will, C.M. Haglund, M.J. Ackerman, Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing, *Heart Rhythm* 2 (2005) 507–517.
- [119] C. Napolitano, E. Ronchetti, M. Memmi, J. Nastoli, C. Faggiano, P.J. Schwartz, S.G. Priori, Molecular epidemiology of the long QT syndrome in a cohort of 267 probands, *J. Am. Coll. Cardiol.* 37 (Suppl. A) (2001) 87A.
- [120] S.G. Priori, Inherited arrhythmogenic diseases: the complexity beyond monogenic disorders, *Circ Res.* 94 (2004) 140–145.
- [121] S.G. Priori, C. Napolitano, P.J. Schwartz, Low penetrance in the long-QT syndrome: clinical impact, *Circulation* 99 (1999) 529–533.
- [122] N. Neyroud, F. Tesson, I. Denjoy, M. Leibovici, C. Donger, J. Barhanin, S. Faure, F. Gary, P. Coumel, C. Petit, K. Schwartz, P. Guicheney, A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardio-auditory syndrome, *Nat. Genet.* 15 (1997) 186–189.
- [123] P.J. Schwartz, S.G. Priori, C. Spazzolini, A.J. Moss, G.M. Vincent, C. Napolitano, I. Denjoy, P. Guicheney, G. Breithardt, M.T. Keating, J.A. Towbin, A.H. Beggs, P. Brink, A.A. Wilde, L. Toivonen, W. Zareba, J.L. Robinson, K.W. Timothy, V. Corfield, D. Wattanasirichaigoon, C. Corbett, W. Haverkamp, E. Schulze-Bahr, M.H. Lehmann, K. Schwartz, P. Coumel, R. Bloise, Genotype–phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias, *Circulation* 103 (2001) 89–95.
- [124] A.J. Moss, W. Zareba, E.S. Kaufman, E. Gartman, D.R. Peterson, J. Benhorin, J.A. Towbin, M.T. Keating, S.G. Priori, P.J. Schwartz, G.M. Vincent, J.L. Robinson, M.L. Andrews, C. Feng, W.J. Hall, A. Medina, L. Zhang, Z. Wang, Increased risk of arrhythmic events in long-QT syndrome with mutations in the pore region of the human ether-a-go-go-related gene potassium channel, *Circulation* 105 (2002) 794–799.
- [125] S.G. Priori, P.J. Schwartz, C. Napolitano, R. Bloise, E. Ronchetti, M. Grillo, A. Vicentini, C. Spazzolini, J. Nastoli, G. Bottelli, R. Folli, D. Cappelletti, Risk stratification in the long-QT syndrome, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 1866–1874.
- [126] P. Brugada, J. Brugada, Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report (see comments), *J. Am. Coll. Cardiol.* 20 (1992) 1391–1396.
- [127] Y. Hata, N. Chiba, K. Hotta, Incidence and clinical significance of right bundle branch block and ST-segment elevation in V1–V3 in 6- to 18-year old school-children in Japan, *Circulation* 20 (1997) 2310.
- [128] J.S. Hermida, J.L. Lemoine, F.B. Aoun, G. Jarry, J.L. Rey, J.C. Quiret, Prevalence of the Brugada syndrome in an apparently healthy population, *Am. J. Cardiol.* 86 (2000) 91–94.
- [129] M. Vatta, R. Dumaine, G. Varghese, T.A. Richard, W. Shimizu, N. Aihara, K. Nademanee, R. Brugada, J. Brugada, G. Veerakul, H. Li, N.E. Bowles, P. Brugada, C. Antzelevitch, J.A. Towbin, Genetic and biophysical basis of sudden unexplained nocturnal death syndrome (SUNDS), a disease allelic to Brugada syndrome, *Hum. Mol. Genet.* 11 (2002) 337–345.
- [130] Q. Chen, G.E. Kirsch, D. Zhang, R. Brugada, J. Brugada, P. Brugada, D. Potenza, A. Moya, M. Borggrefe, G. Breithardt, R. Ortiz-Lopez, Z. Wang, C. Antzelevitch, R.E. O'Brien, E. Schulze-Bahr, M.T. Keating, J.A. Towbin, Q. Wang, Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation, *Nature* 392 (1998) 293–296.
- [131] S.G. Priori, C. Napolitano, M. Gasparini, C. Pappone, P. Della Bella, M. Brignole, U. Giordano, T. Giovannini, C. Menozzi, R. Bloise, L. Crotti, L. Terreni, P.J. Schwartz, Clinical and genetic heterogeneity of right bundle branch block and ST-segment elevation syndrome: a prospective evaluation of 52 families, *Circulation* 102 (2000) 2509–2515.
- [132] H. Morita, K. Kusano-Fukushima, S. Nagase, Y. Fujimoto, K. Hisamatsu, H. Fujio, K. Haraoka, M. Kobayashi, S.T. Morita, K. Nakamura, T. Emori, H. Matsubara, K. Hina, T. Kita, M. Fukutani, T. Ohe, Atrial fibrillation and atrial vulnerability in patients with Brugada syndrome, *J. Am. Coll. Cardiol.* 40 (2002) 1437–1444.
- [133] C. Antzelevitch, Genetic basis of Brugada syndrome, *Heart Rhythm* 4 (2007) 756–757.
- [134] J.J. Schott, C. Alsinawi, F. Kyndt, V. Probst, T.M. Hoornjste, M. Hulsbeek, A.A. Wilde, D. Escande, M.M. Mannens, H. Le Marec, Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A, *Nat. Genet.* 23 (1999) 20–21.
- [135] D.W. Benson, D.W. Wang, M. Dymont, T.K. Knifans, F.A. Fish, M.J. Strieper, T.H. Rhodes, A.L. George Jr., Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A), *J. Clin. Invest.* 112 (2003) 1019–1028.
- [136] H. Watanabe, T.T. Koopmann, S. Le Scouarnec, T. Yang, C.R. Ingram, J.J. Schott, S. Demolombe, V. Probst, F. Anselme, D. Escande, A.C. Wiesel, A. Pfeufer, S. Käbb, H.E. Wichmann, C. Hasdemir, Y. Aizawa, A.A. Wilde, D.M. Roden, C.R. Bezzina, Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans, *J. Clin. Invest.* 118 (6) (2008) 2260–2268.
- [137] P.J. Mohler, I. Rivolta, C. Napolitano, G. LeMaillet, S. Lambert, S.G. Priori, V. Bennett, Nav1.5 I053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 17533–17538.
- [138] B. London, M. Michalec, H. Mehdi, X. Zhu, L. Kerchner, S. Sanyal, P.C. Viswanathan, A.E. Pfahnl, L.L. Shang, M. Madhusudan, C.J. Baty, S. Laguna, R. Aleong, R. Gutmann, M.J. Ackerman, D.M. McNamara, R. Weiss, S.C. Dudley Jr., Mutation in glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) decreases cardiac Na current and causes inherited arrhythmias, *Circulation* 116 (2007) 2260–2268.
- [139] C. Antzelevitch, G.D. Pollevick, J.M. Cordeiro, O. Casis, M.C. Sanguinetti, Y. Aizawa, A. Guerschicoff, R. Pfeiffer, A. Oliva, B. Wolnik, P. Gelber, E.P. Bonaros Jr., E. Burashnikov, Y. Wu, J.D. Sargent, S. Schickel, R. Oberheiden, A. Bhatia, L.F. Hsu, M. Haissaguerre, R. Schimpf, M. Borggrefe, C. Wolfert, Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death, *Circulation* 115 (2007) 442–449.
- [140] C.R. Bezzina, W. Shimizu, P. Yang, T.T. Koopmann, M.W. Tanck, Y. Miyamoto, S. Kamakura, D.M. Roden, A.A. Wilde, Common sodium channel promoter haplotype in Asian subjects underlies variability in cardiac conduction, *Circulation* 113 (2006) 338–344.
- [141] S.G. Priori, C. Napolitano, M. Gasparini, C. Pappone, P.D. Bella, U. Giordano, R. Bloise, C. Giustetto, R. De Nardis, M. Grillo, E. Ronchetti, G. Faggiano, J. Nastoli, Natural history of Brugada syndrome: insights for risk stratification and management, *Circulation* 105 (2002) 1342–1347.
- [142] P. Coumel, J. Fidelle, V. Lucet, P. Attuel, Y. Bouvrain, Catecholamine-induced severe ventricular arrhythmias with Adams-Stokes syndrome in children: report of four cases, *Br. Heart J.* 40 (Suppl.) (1978) 28–37.

Estudio genético de la muerte súbita cardíaca: Miocardiopatía Hipertrófica Familiar y Síndrome de QT Largo.

M.S. Rodríguez-Calvo et al. / *Forensic Science International* 182 (2008) 1–12

- 43] A. Leenhardt, V. Lucet, I. Denjoy, F. Grau, D.D. Ngoc, P. Coumel, Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in children: A 7-year follow-up of 21 patients, *Circulation* 91 (1995) 1512–1519.
- 44] S.G. Priori, C. Napolitano, N. Tiso, M. Memmi, G. Vignati, R. Bloise, V. Sorrentino, G.A. Danieli, Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, *Circulation* 103 (2001) 196–200.
- 45] P.J. Laitinen, K.M. Brown, K. Piiippo, H. Swan, J.M. Devaney, B. Brahmabhatt, E.A. Donarum, M. Marino, N. Tiso, M. Viitasalo, L. Toivonen, D.A. Stephan, K. Kontula, Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia, *Circulation* 103 (2001) 485–490.
- 46] H. Lahat, E. Pras, T. Oelender, et al., A missense mutation in a highly conserved region of CASQ2 is associated with autosomal recessive catecholamine-induced polymorphic ventricular tachycardia in Bedouin families from Israel, *Am. J. Hum. Genet.* 69 (2001) 1378–1384.
- 47] S.G. Priori, C. Napolitano, M. Memmi, et al., Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, *Circulation* 106 (2002) 69–74.
- 48] M. Cerrone, B. Colombi, R. Bloise, M. Memmi, C. Moncalvo, D. Potenza, F. Drago, C. Napolitano, D.J. Bradley, S.G. Priori, Clinical and molecular characterization of a large cohort of patients affected with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, *Circulation* 110 (Suppl. II) (2004) 552–553.
- 49] G. Choi, L.J. Kopplin, D.J. Tester, M.L. Will, C.M. Haglund, M.J. Ackerman, Spectrum and frequency of cardiac channel defects in swimming-triggered arrhythmia syndromes, *Circulation* 110 (2004) 2119–2124.
- 50] D.J. Tester, E. Carturan, M. Dura, S. Reiken, A. Wronski, A.R. Marks, M.J. Ackerman, Molecular and functional characterization of novel RyR2-encoded cardiac ryanodine receptor/calcium release channel mutations in sudden infant death syndrome, *Heart Rhythm* 3 (Suppl. I) (2006) S67.
- 51] M.R. Di Barletta, S. Viatchenko-Karpinski, A. Nori, M. Memmi, D. Terentyev, F. Turcato, G. Valle, N. Rizzi, C. Napolitano, S. Gyorke, P. Volpe, S.G. Priori, Clinical phenotype and functional characterization of CASQ2 mutations associated with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, *Circulation* 114 (2006) 1012–1019.
- 52] I. Gussak, P. Brugada, J. Brugada, R.S. Wright, S.L. Kopecky, B.R. Chaitman, P. Bjerregaard, Idiopathic short QT interval: a new clinical syndrome? *Cardiology* 94 (2000) 99–102.
- 53] F. Gaita, C. Giustetto, F. Bianchi, C. Wolpert, R. Schimpf, R. Riccardi, S. Grossi, E. Richiardi, M. Borggrefe, Short QT syndrome. A familial cause of sudden death, *Circulation* 108 (2003) 965.
- 54] C. Bellocci, A.C.G. van Ginneken, C.R. Bezzina, M. Alders, D. Escande, M.M. Mannens, I. Baró, A.A. Wilde, Mutation in the KCNQ1 gene leading to the short QT-interval syndrome, *Circulation* 109 (2004) 2394–2397.
- 55] R. Brugada, K. Hong, R. Dumaine, J. Cordeiro, F. Gaita, M. Borggrefe, T.M. Menendez, J. Brugada, G.D. Pollevick, C. Wolpert, E. Burashnikov, K. Matsuo, Y.S. Wu, A. Guericoff, F. Bianchi, C. Giustetto, R. Schimpf, P. Brugada, C. Antzelevitch, Sudden death associated with short-QT syndrome linked to mutations in HERG, *Circulation* 109 (2004) 30–35.
- [156] S.G. Priori, S.V. Pandit, I. Rivolta, O. Berenfeld, E. Ronchetti, A. Dhamoon, C. Napolitano, J. Anumonwo, M.R. di, S. Barletta, G. Gudapakkam, M. Bosi, J. Stramba-Badiale, J. Lillie, A novel form of short QT syndrome (SQTS) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene, *Circ. Res.* 96 (2005) 800–807.
- [157] Y.H. Chen, S.J. Xu, S. Bendahhou, X.L. Wang, Y. Wang, W.Y. Xu, H.W. Jin, H. Sun, X.Y. Su, Q.N. Zhuang, Y.Q. Yang, Y.B. Li, Y. Liu, H.J. Xu, X.F. Li, N. Ma, C.P. Mou, Z. Chen, J. Barhanin, W. Huang, KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation, *Science* 299 (2003) 251–254.
- [158] P. Vanezis, S. Leadbetter, Next of kin clinics: a new role for the pathologist, *J. Clin. Pathol.* 52 (1999) 723–724.
- [159] M. Di Paolo, D. Luchini, R. Bloise, S.G. Priori, Postmortem molecular analysis in victims of sudden unexplained death, *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 25 (2004) 182–184.
- [160] B. Sobrino, M. Brion, A. Carracedo, SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies, *Forensic Sci. Int.* 154 (2–3) (2005) 181–194.
- [161] M. Brion, C. Allegue, M. Torres, I. Quintela, L. Concheiro, M.S. Rodríguez-Calvo, A. Carracedo, Finding genetic causes of sudden cardiac death, *Forensic Sci. Int.: Genetics*, in press.
- [162] E. Behr, D.A. Wood, M. Wright, P. Syrris, M.N. Sheppard, A. Casey, M.J. Davies, W. McKenna, Sudden Arrhythmic Death Syndrome Steering Group, Cardiologic assessment of first degree relatives in sudden arrhythmic death syndrome, *Lancet* 362 (2003) 1457–1459.
- [163] H.L. Tan, N. Hofman, I.M. van Langen, A.C. van der Wal, A.A. Wilde, Sudden unexplained death: heritability and diagnostic yield of cardiologic and genetic examination in surviving relatives, *Circulation* 112 (2005) 207–213.
- [164] M.J. Ackerman, D.J. Tester, C.J. Porter, W.D. Edwards, Molecular diagnosis of the inherited long-QT syndrome in a woman who died after near-drowning, *N. Engl. J. Med.* 341 (1999) 1121–1125.
- [165] M.J. Ackerman, D.J. Tester, D.J. Driscoll, Molecular autopsy of sudden unexplained death in the young, *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 22 (2001) 105–111.
- [166] S.S. Chugh, O. Senashova, A. Watts, P.T. Tran, Z. Zhou, Q. Gong, J.L. Titus, S.J. Haylick, Postmortem molecular screening in unexplained sudden death, *J. Am. Coll. Cardiol.* 43 (2004) 1625–1629.
- [167] D.J. Tester, D.B. Spoon, H.H. Valdivia, J.C. Makielski, M.J. Ackerman, Targeted mutational analysis of the RyR2-encoded cardiac ryanodine receptor in sudden unexplained death: a molecular autopsy of 49 medical examiner/coroner's cases, *Mayo Clin. Proc.* 79 (2004) 1380–1384.
- [168] S.G. Priori, C. Napolitano, U. Giordano, G. Collisani, M. Memmi, Brugada syndrome and sudden cardiac death in children, *Lancet* 355 (2000) 808–809.
- [169] M.J. Ackerman, B.L. Sui, W.Q. Sturner, D.J. Tester, C.R. Valdivia, J.C. Makielski, J.A. Towbin, Postmortem molecular analysis of SCN5A defects in sudden infant death syndrome, *JAMA* 286 (2001) 2264–2269.
- [170] J. Underwood, Resuscitating the teaching autopsy, *BMJ* 327 (2003) 803–804.

1.2. Artículo 2: New technologies in the genetic approach to sudden cardiac death in the young

El amplio espectro de genes y de variantes genéticas implicados en la MSC motiva la revisión que se presenta en el siguiente artículo, publicado en *Forensic Science International*. La MSC da lugar a autopsias en las que no se puede determinar la causa de la muerte, lo cual supone uno de los grandes retos en la práctica forense. En este trabajo se revisan las diferentes estrategias de genotipado de alto rendimiento disponibles que podrían ser de gran utilidad en el estudio concreto de los factores genéticos de la MSC. Las plataformas de estudio genético a gran escala permiten una actualización rápida de los estudios genéticos, fundamental a la vista de la rapidez con que se describen variantes y genes implicados. Estas plataformas permiten el estudio de mutaciones ya descritas, secuenciar regiones de genes ya conocidas mediante secuenciación de nueva generación (NGS) y estudiar genomas completos.



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/forsciint



Review

New technologies in the genetic approach to sudden cardiac death in the young[☆]

M. Brion^{a,b,*}, I. Quintela^{a,c}, B. Sobrino^{a,c}, M. Torres^{a,c}, C. Allegue^{a,b}, A. Carracedo^{a,c}

^a Genomics Medicine Group, Galician Foundation of Genomic Medicine and University of Santiago de Compostela, CIBERER, Santiago de Compostela, Spain

^b Genetics of Cardiovascular and Ophthalmologic Diseases, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS), IDIS, Santiago de Compostela, Spain

^c Institute of Legal Medicine and National Genotyping Center (CEGEN), University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Available online xxx

Keywords:
Sudden cardiac death
Cardiomyopathies
Arrhythmic diseases
Mutation screening
Next generation sequencing
Genome wide association studies

ABSTRACT

Sudden cardiac death (SCD) is a major health problem and constitutes one of the most important unsolved challenges in the practice of forensic pathology due to the failure to determine the cause of death. Particularly, an important number of previously healthy young people who have died suddenly and unexpectedly are consequence of genetic heart disorders, either structural cardiomyopathies or arrhythmogenic abnormalities.

The technological approach to analyze this type of genetically heterogeneous disorders is far from easy but nowadays the variety of chemistries and methodologies improves choice.

This review offers to the reader a state of the art of the available technologies for the study of genetics of sudden cardiac death, including mutation screening approaches, genome wide association studies, and the recently developed next-generation sequencing.

© 2010 Published by Elsevier Ireland Ltd.

Contents

1. Introduction	000
2. Mutation screening	000
2.1. Sequenom MassArray	000
2.2. Arrayed primer extension (APEX) technology	000
2.3. Illumina Goldengate genotyping assay with Veracode technology	000
2.4. Taqman and OpenArray Genotyping System	000
3. Scanning known genes	000
3.1. Next-generation DNA sequencing	000
3.1.1. Targeted resequencing	000
3.1.2. Template preparation	000
3.1.3. NGS platforms	000
3.2. Affymetrix resequencing	000
4. Searching for new genes	000
4.1. Affymetrix' solutions for GWAS	000
4.1.1. Affymetrix GeneChip Human Mapping Arrays	000
4.1.2. Axiom Genome-Wide Human Arrays	000
4.2. Illumina's solutions for GWAS	000
4.3. Exome sequencing	000
5. Discussion	000
References	000

1. Introduction

Genetics is having a major impact in many medical specialities. This genetic revolution was initiated with the knowledge of the human genome and has advanced exponentially linked to the development of new genomic technologies which have allowed

[☆] This paper is part of the special issue entitled: Molecular Pathology in Forensic Medicine, Guest-edited by Burkhard Madea and Pekka Saukko.

* Corresponding author at: Institute of Legal Medicine, San Francisco s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain. Tel.: +34 881812311; fax: +34 981580336.
E-mail address: maria.brion@usc.es (M. Brion).

the identification of the genetic basis of a very large number of diseases. Genetics is having an important impact in forensic science and not only for the introduction of forensic DNA typing but also in forensic pathology and toxicology. A good example of

the application of genomics in forensic science is the investigation of sudden cardiac death (SCD).

SCD is defined as an unexpected death from a cardiac cause occurring within a short time, generally within 1 h of symptom

Table 1
Genetic basis of SCD associated diseases.

Gen	Locus	Protein	Frequency in patients	HGMD ^a public mutations ^a	HGMD ^a professional mutations ^b
Sarcomeric HCM					
ACTC1	15q14	α -Cardiac actin	Rare	9	15
MYBPC3	11p11.2	Cardiac myosin-binding protein C	25–35%	168	243
MYH6	14q11.2-q12	α -Myosin heavy chain	Rare	7	7
MYH7	14q11.2-q12	β -Myosin heavy chain	25–35%	229	292
MYL2	12q23-q24.3	Regulatory myosin light chain	Rare	10	13
MYL3	3p21.2-p21.3	Essential myosin light chain	Rare	6	9
TNNC1	3p21.1	Troponin C	Rare	2	7
TNNI3	19p13.4	Cardiac troponin I	1–5%	34	40
TNNI2	1q32	Cardiac troponin T	3–5%	39	53
TPM1	15q22.1	α -Tropomyosin	1–5%	13	16
TTN	2q31	Titin	Very rare	16	23
Other HCM genes					
ACTN2	1q42-q43	α -Actinin 2	Rare	1	5
CSRP3	11p15.1	Muscle LIM protein	Rare	9	13
LDIB3	10q22.2-q23.3	LIM domain binding 3	Rare	5	5
MYOZ2	4q26-q27	Myosin 2	Rare	2	2
TCAP	17q12-q21.1	Telethonin	Rare	8	14
VCL	10q22.1-q23	Vinculin/metavinculin	Rare	1	1
JPH2	20q12	Junctophilin 2	Rare	1	4
PLN	6q22.1	Phospholamban	Rare	3	5
FXN	9q13	Frataxin	Rare	39	46
GLA	Xq22	α -Galactosidase A	Rare	473	532
LAMP2	Xq24	Lysosome-associated membrane protein 2	Rare	21	35
PRKAG2	7q35-q36.36	AMP-activated protein kinase	Rare	11	14
RAF1	3p25.2	RAF serine/threonine kinase	Rare	2	20
ARVC					
DSC2	18q21	Desmocollin 2	Rare	3	6
DSCG2	18q12.1-q12.2	Desmoglein 2	10–15%	23	31
DSP	6p24	Desmoplakin	10–20%	21	35
JUP	17q21	Plakoglobin	Rare	1	3
PKP2	12p11	Plakophilin 2	25%	49	74
RYR2	1q42.1-q43	Cardiac ryanodine receptor	Rare	59	130
TGFB3	14q23-q24	Transforming growth factor β -3	Rare	2	2
TMEM43	3p25	Transmembrane protein 43	Rare	0	
Long QT syndrome					
KCNQ1	11p15.5	Kv7.1	30–35%	272	403
KCNH2	7q35-36	Kv11.1	25–30%	319	606
SCN5A	3p21-p24	NaV1.5	5–10%	202	559
ANK2	4q25-q27	Ankyrin B	Rare	8	15
AKAP9	7q21-q22	Yotiao	Rare	1	2
CACNA1C	12p13.3	L-Type calcium channel	Rare	3	4
CAV3	3p25	Caveolin-3	Rare	27	40
KCNE1	21q22.1	Mink	Rare	21	37
KCNE2	21q22.1	MIRP1	Rare	12	19
KCNJ2	17q23	Kir2.1	Rare	42	45
SCN4B	11q23.3	Sodium channel β 4	Rare	0	
SNR1A	20q11.2	Syntrophin- α 1	Rare	0	
Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia					
CASQ2	1p13.3	Calsequestrin 2	Rare	6	11
RYR2 (CPVT1)	1q42.1-q43	Ryanodine receptor	50–60%	59	130
Brugada syndrome					
CACNA1C	2p13.3	L-Type calcium channel	?	3	4
CACNB2	10p12	L-Type calcium channel β 2 subunit	?	1	2
KCNE3	11q13.4	MIRP2	?	3	6
SCN1b	19q13.1	Sodium channel β 1	?	4	8
SCN5A	3p21-p24	NaV1.5	20–30%	202	559
GPD1L	3p22.3	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like	Rare	0	
Short QT syndrome					
KCNH2	7q35-36	Kv11.1	?	319	606
KCNJ2	17q23	Kir2.1	?	42	45
KCNQ1	11p15.5	Kv7.1	?	272	403

^a Mutations included in the public version of Human Gene Mutation Database (mutations causing or associated with human inherited disease, plus disease-associated/functional polymorphisms reported in the literature) [88].

^b Mutations included in the Professional Human Gene Mutation Database.

onset, in a person with or without pre-existing heart disease [1]. SCD in young adults < 35 years of age is caused mostly by cardiac genetic disorders that ultimately result in lethal ventricular arrhythmias [2,3]. Most of these juvenile SCDs in young people manifest in the setting of inherited cardiomyopathies such as hypertrophic cardiomyopathy (HCM), arrhythmogenic right ventricle cardiomyopathy (ARVD), and as a consequence of ion channel mutations responsible for inherited abnormalities, such as the long/short QT syndromes (LQTS/SQTS), Brugada syndrome (BrS), and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia [4,5].

Most of these diseases are genetically heterogeneous making genetic diagnosis and genetic counselling difficult. For instance HCM is a disease of remarkable genetic heterogeneity with hundreds of mutations scattered over at least 30 genes that encode essential sarcomeric, calcium-handling, and metabolic regulatory proteins (Table 1) [6,7]. In ARVD eight susceptibility genes and three additional genetic loci have been identified (Table 1) and the identification of a pathogenic mutation categorized as associated or probably associated with ARVC in the patient under evaluation is now included in the recently published modification of the Task force criteria for diagnosis [8]. Mutations in 13 genes have been involved in the correct execution of cardiac action potential, associated with both LQTS and SQTS. According to one of the last published mutation update in LQTS, identification of a disease causing mutation is possible in 70–80% of the cases [9].

The combination of the knowledge of the genes involved in the different cause of SCD and the availability of various genomic technologies has entailed a considerable advance in the number of cases than can be diagnosed with a benefit not only for finding the cause of death but also for genetic counselling of relatives at risk.

Genomics in forensics is also a promising field of research. Some genome wide association studies (GWAS) have been published, most of them focusing on finding common variation involved in ion channel and developmental genes in atrial and atrioventricular conduction as well as in susceptibility to atrial fibrillation and therefore responsible of cardiac sudden death [10,11].

The aim of this paper is to present the state of the art of the different technologies and genetic approaches available for the diagnosis and research of sudden cardiac death (Fig. 1). Advantages and disadvantages of its application to the study of cardiac genetic diseases will be discussed in terms of throughput, accuracy and cost-effectiveness.

2. Mutation screening

Most of the cardiomyopathies that may evolve into sudden death have a familial genetic component. They generally show an

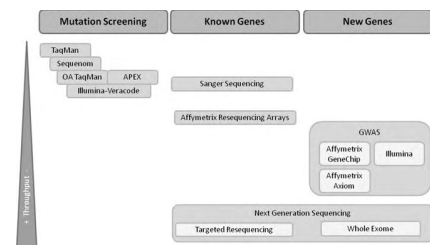


Fig. 1. New technologies applied to study of genes involved in sudden cardiac death. The technologies are distributed vertically according to throughput, but the distance between them has no significance.

autosomal pattern of inheritance and currently, a large number of mutations in a variety of genes have been described as cause of the disease (Table 1). The vast majority of genetic studies made to date have focused on the sequencing of known genes by conventional methods. The work and effort of many researchers have enabled to meet a huge number of causative mutations in each of the genes involved in cardiomyopathies, which can be studied directly with mutation screening technologies.

2.1. Sequenom MassArray

The Sequenom MassArray system employs matrix assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry as detection system. The iPLEX GOLD chemistry consists of a multiplex PCR followed by SAP purification and a SBE (single base extension) reaction. The products of this reaction are desalted using an anion exchange resin and spotted on proprietary matrix coated chips: Spectrochips to permit MALDI-TOF analysis. The mass of the primer extension products are determined and translated into the corresponding alleles, the incorporation of each nucleotide generating a difference in the mass of the extension product. Each multiplex reaction is performed in a single well, in 384-well microtitre plate format, allowing the determination of up to 36 variants in 384 separate samples per experiment [12].

The main advantage of Sequenom related to mutation detection is the simplicity and flexibility of the chemistry that can determine single base changes (SNPs or mutations), non bi-allelic changes, insertions and deletions (up to 40 bp in length) and MNVs (multinucleotide variations) with the same primer extension reaction (Table 2). In addition the same approach can detect unexpected changes such as de novo mutations, for example a T in an expected A/C mutation creates a peak with the corresponding mass not recognized automatically but detectable by a trained technician.

Another key advantage is that the chemistry requires simple unmodified oligonucleotide primers with low per base cost, while the in-house assay design software offers the option to reorganize tested assays or to include additional new variations in established assays.

Examples of the application of this technology to the study of sudden cardiac death are the published studies of Allegue et al. [13] and Brion et al. [14], where known mutations in long QT syndrome and hypertrophic cardiomyopathy, respectively, are analysed. Allegue et al. [13] developed a diagnostic approach for long QT syndrome and Brugada syndrome based on published mutations and Sequenom MassArray system. They analysed 433 mutations in three diagnostic tests, oriented to each of the three most prevalent genes in the long QT syndrome. Brion et al. [14] used the same approach to detect 550 mutations in 16 genes associated with hypertrophic cardiomyopathy. Fig. 2 shows an example of a HCM mutation image detected using the Sequenom MassArray System.

Table 2
Targeted genotyping technologies.

Technology	Plexing level ^a	4 Alleles ^b	Indels ^c	MNVs ^d
Sequenom MassArray	40	Yes	40 bp	Yes
Taqman OpenArray	256	No	6 bp	Yes
Illumina Goldengate	384	No	1 bp	No
APEX	640	Yes	25 bp	Yes

The table collects the main characteristics of targeted genotyping technologies:

^a Maximum plexing level per reaction.

^b Detection of more than two alleles.

^c Maximum size of insertions-deletions.

^d Detection of multinucleotide variations.

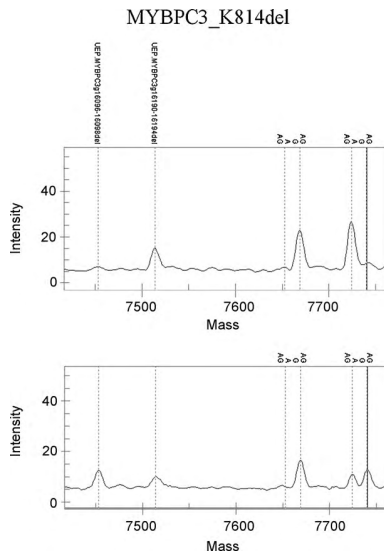


Fig. 2. MassArray detection of K814del genetic variation at MYBPC3 gene. (A) Spectrum aspect of a non-mutated sample. (B) Spectrum of a mutated sample.

2.2. Arrayed primer extension (APEX) technology

This technology also uses SBE as the allelic discrimination reaction but the detection system consists of hybridization of target DNA to an array consequently read by dye fluorescence. A microarray glass slide contains the capture oligonucleotides immobilized on the surface, two per site tested (sense and antisense strands). Posterior hybridization of the target DNA, previously amplified and fragmented, generates the template for the SBE reaction using fluorescently labeled ddNTPs, typically fluorescein, cyanine3 (Cy3), cyanine5 (Cy5), and Texas Red. The four color system enables the simultaneous detection of all four alleles per position [15].

An improvement of the technology has been achieved using just a pair of oligonucleotides per SNP or mutation known as APEX2. The APEX2 primers are specific of each variation, containing a region complementary to the genomic DNA sequence but include a universal sequence and an amino modification at the 5' end so they are jointly used for both amplification and detection. The amplification comprises two phases: a first phase PCR for specific amplification of the target region, the resulting sequence contains a nucleotide complementary to the position of interest and the universal sequence, then a second PCR with universal primers to produce the SBE template. Both strands of the purified product hybridize to APEX-2 primers immobilized on the microarray followed by four-color single base extension [16].

The flexibility of the design allows the simultaneous analysis of multiple types of variants including insertions, deletions and mutations (Table 2), and the incorporation of new variants on developed microarrays (Table 2). The system is commercially available through the Genorama Company, in addition offers genetic testing APEX microarrays for some diseases (mutations in BRCA, CFTR, etc) (<http://www.genorama.com>).

2.3. Illumina Goldengate genotyping assay with Veracode technology

Each Goldengate assay determines between 48 and 384 SNPs through a combination of OLA, oligonucleotide ligation, and allele-specific extension reactions. The DNA is activated to allow binding to paramagnetic particles followed by annealing of three primers per SNP: two allele-specific primers (ASOs) and one locus specific primer (LSO). These oligonucleotides contain universal PCR primer sites and the LSO besides has a sequence complementary to a tag present in a specific Veracode microbead. The ASO primer complementary to the allele present in the genomic DNA is extended and ligated to the LSO, providing a template for the universal PCR using Cy3- and Cy5-labeled primers. The final step is a hybridization of the dye-labeled single-stranded DNA to the complementary beads addressing each locus to a specific tag, followed by fluorescent detection and automated genotype clustering and calling. The laser can inspect each digitally inscribed Veracode microbead to generate a unique code image for locus identification [17].

Goldengate custom assays using Veracode technology can interrogate 48, 96, 144, 192 or 384 SNPs in a single plex, but it is limited to bi-allelic SNPs and single base pair insertions/deletions (Table 2).

2.4. Taqman and OpenArray Genotyping System

Taqman Genotyping Assays (Applied Biosystems) use two allele-specific minor groove binder (MGB) probes (labeled with FAM and VIC) and two PCR primers. The Taqman principle relies on the 5'-3' nuclease activity of Taq polymerase to cleave 5' terminal nucleotides of double stranded DNA, releasing the reporter dye from the MGB probe hybridized to the complementary target sequence, followed by fluorescence detection [18–20]. This technology allows the detection of bi-allelic SNPs, as well as insertions, deletions and MNPs up to 6 bases in length.

The recent launch of the OpenArray Genotyping System creates a step forward in the throughput of the Taqman platform. The system combines Taqman Genotyping Assays preloaded in plate format with OpenArray technology using nanoliter fluids for low-volume solution-phase reactions (33 nL per reaction). OpenArray technology utilizes a plate that has the size of a microscope slide with 3072 reaction cavities, arranged in 48 sub-arrays of 64 holes, where up to 256 SNPs can be screened simultaneously in 12 samples. There are different formats available, to analyze between 64 and 256 SNPs in various sample numbers per array (Table 2).

One of the main advantages of Taqman are the high number of validated assays as pre-designed SNP Genotyping Assays currently numbering over 4.5 million genome-wide SNP site, including 160,000 validated assays, as well as 70,000 high value non-synonymous coding SNPs (including known disease mutations and SNPs in protein domains associated with drug binding regions).

One example of the Taqman technology applied to the study of sudden cardiac death is the article of Hernesniemi et al. [21] where Taqman 5' nuclease assay was used to genotype the study population of the Helsinki Sudden Death Study, comprising medicolegal autopsies of 700 men. They found that hypertension interacts with IL-18 gene promoter -137 G/C polymorphism, affecting the risk of SCD and the development of coronary atherosclerosis.

3. Scanning known genes

3.1. Next-generation DNA sequencing

Sanger sequencing has been the technology used for scanning known genes to study genetic variation during the last three decades. Despite of many technical improvements during this

period, its throughput is limited and large-scale projects are expensive and time-consuming. An example of this limitation is the completion of human genome sequence [22], which was only possible with the use of hundreds of sequencing machines working for many years.

In the last years, massively parallel DNA sequencing platforms, known as next-generation sequencing (NGS) technologies, have been developed opening new opportunities to explore genome-wide biological questions and changing the strategies for diagnostic of genetic diseases. Several platforms are commercially available.

3.1.1. Targeted resequencing

Even though NGS technologies are rapidly advancing, the cost of whole genome sequencing remains too high to apply to large numbers of human samples. Consequently, target enrichment methods have been developed for capturing the genomic regions of interest from a DNA sample before sequencing. Enrichment has to be uniform and efficient to enable maximal consensus coverage of the target region with sufficient depth for accurate base calling and with minimal sequencing effort. The method should not interfere with accuracy of base calling by causing allelic bias or dropout [23,24].

Although traditional PCR enriches target sequences with high specificity and sensitivity, it is difficult to scale the method to take advantage of the throughput of NGS technologies. However, singleplex PCR amplification using high-fidelity polymerases is used to analyze large kilobase-sized contiguous intervals [25].

Tewhey et al. developed a method, involving microdroplet-PCR technology, for massive parallel amplification of complex target sequences taking advantages of the high sensitivity and specificity of PCR [26]. A microfluidic device creates aqueous picoliter-volume droplets of primers pair in oil solution. The primer droplets that are targeted to different regions of the genome merge with separate droplets that contain fragmented genomic DNA and PCR reagents. These mixed droplets are thermal cycled in a single tube. The encapsulation of microdroplet-PCR reactions prevents possible primer pair interactions allowing an efficient simultaneous amplification of up to 4000 targeted sequences. This strategy is commercialized by RainDance Technologies and they have announced that this number will reach 20,000 in 2010 introducing five primer pairs in each droplet to perform a five-plex PCR.

Other approach is based on multiplex amplification of thousands of target sequences in a single tube by array-synthesized molecular inversion probes, which initially have been developed for multiplex target detection and SNP typing [27,28]. In this method, probes consisting of a universal spacer region flanked by target-specific sequences are designed for each amplicon. These probes anneal at either sides of target region and the gap is filled by a DNA polymerase and a ligase [29,30].

Other strategy is capture by hybridization, both on-array capture and in-solution capture. Roche NimbleGen and collaborators were the first to adapt array hybridization to be compatible with NGS [31–33]. Agilent 244K Array has also been used for target enrichment [34] and other on-array capture method using shorter probes has been reported [35,36].

To avoid the disadvantages of working with microarrays (expensive equipment and low throughput) in-solution capture methods has been developed by NimbleGen and Agilent [37]. The principle is similar to on-array capture, but in this case the specific probes designed to target region of interest from a sequencing library are in solution instead of attached to the surface of an array.

For many applications, such as clinical diagnosis where only few genes are interesting, the current throughput of NGS technologies is too high. However, this capacity can be used to reduce costs if it would be possible to sequence several samples per run. This purpose can be achieved both with physical separation of the samples and using sample-identifying barcodes.

3.1.2. Template preparation

The template preparation for NGS technologies involves random shearing of DNA into smaller sizes to create fragment libraries. After library preparation, most of the technologies use clonal amplification of the templates before sequencing reactions, however, there are some approaches to sequences single-molecules avoiding this preliminary step.

The 454 Genome Sequencer (Roche and 454 Sequencing) and SOLiD system (Applied Biosystems) use emulsion PCR on beads [38] for fragment library amplification, using a water in oil emulsion to isolate single DNA molecules in aqueous micro-reactors containing one bead and PCR reagents. DNA fragments are ligated with specific adapters during library preparation. The adapters allow the hybridization of the fragments to one of the universal PCR primers attached to the surface of beads.

The Illumina Genome Analyzer (Illumina Inc.) relies on bridge PCR [39,40] to amplify sequencing features. In this approach, forward and reverse PCR primers are tethered to a solid surface, and as a consequence, amplification products originating from any single template molecule remain immobilized and clustered to a physical position on the array. Each single-stranded fragment, immobilized at one end on the surface, creates a bridge structure by hybridizing with its free end to the complementary adapter on the surface of the support.

In contrast with previous technologies, Helicos Genetic Analysis System (Helicos Bioscience Corporation) is a single-molecule sequencer and do not require any amplification of DNA fragment prior to sequence.

3.1.3. NGS platforms

The most widespread NGS platforms are the 454 Genome Sequencer, the Illumina Genome Analyzer and the SOLiD System. In addition, another instrument commercially available is Helicos, the first single-molecule sequencer. In this review, the alternative strategies for DNA sequencing, read length and throughput of each of them is mentioned (Table 3).

The 454 Genome Sequencer was the first NGS platform available as a commercial product [41]. Sequencing is performed by pyrosequencing [42]. In this method the incorporation of a nucleotide by DNA polymerase results in the release of pyrophosphate, which initiates a series of downstream reactions that ultimately produce light by a luciferase. The light can be correlated with which specific nucleotide was incorporated, because the nucleotides are added following a sequential order.

Table 3
NGS platforms specifications according to product information available on company's websites.

Technology	Approach	Read length	Throughput (Gb/run)	Company web site
454 Genome Sequencer	Pyrosequencing	400 bp	1	http://www.454.com
Illumina Genome Analyzer	Sequencing by synthesis	2 × 100 bp	200	http://www.illumina.com
SOLiD System	Sequencing by ligation	2 × 50 bp	100	http://www.appliedbiosystems.com
Helicos System	Single-molecule sequencing	25–55 bp	35	http://www.helicosbio.com

Please cite this article in press as: M. Brion, et al., New technologies in the genetic approach to sudden cardiac death in the young, Forensic Sci. Int. (2010), doi:10.1016/j.forsciint.2010.07.015

The Illumina Genome Analyzer is based on sequencing by synthesis approach [40,43] in which all four nucleotides are added simultaneously to the flow cell channels, along with the polymerase, for incorporation into the oligo-primed cluster fragments obtained after bridge PCR. Unlike 454, fluorescently labeled nucleotide terminators are used on this platform.

The SOLiD system is based on sequencing by ligation and the use of two-base encoded probes [44]. A universal sequencing primer is hybridized to templates and a pool of fluorescently labeled octamer probes containing all possible combination of A, C, G and T at positions 1–5, interrogates the sequence of the unknown template on each bead. Only the probe homologous to the first five bases of the template will be ligated to the universal sequencing primer. Up to 10 cycles of ligation, detection and cleavage record the color at every fifth position.

The Helicos system is the first commercial release of single-molecule sequencing instrument [45]. The DNA fragments are hybridized to primers covalently anchored in random positions on a glass cover slip in a flow cell. The primer, polymerase and labeled nucleotides are added to the glass support. The base incorporated into the synthesis strand is determined by analysis of the emitted light signal. Like in other platforms, many millions of fragments are sequenced at the same time.

Helicos platform was used for whole genome sequencing of a patient with family history of vascular disease and early sudden death [46,47]. Rare variants in three genes that are clinically associated with sudden cardiac death (TMEM43, DSP and MYBPC3) and a variant in LPA consistent with a family history of coronary artery disease were discovered.

3.2. Affymetrix resequencing

Other technology utilized for the diagnostic of miocardiopathies is Affymetrix resequencing arrays. This method is based on sequencing by hybridization, where the differential hybridization of labeled oligonucleotide probes is used to identify variant positions. The probes attached to the surface of the array are designed as a tiling representation of the reference sequence of the genome of interest [48]. Two studies using Affymetrix resequencing arrays for the analysis of miocardiopathies have been published. Waldmuller et al. [49] and Fokstuen et al. [50] have designed Affymetrix resequencing arrays for the study of Hypertrophic Miocardiopathy (HCM). The first one, include the 3 most commonly affected genes in HCM (MYH7, MYBP3 and TNNT2), while the second one include 12 genes clearly implicated in including all coding exons, splice-site junctions and 5' UTRs.

4. Searching for new genes

Genetic association studies have gradually moved from family-based linkage studies to candidate genes strategies and in the last years to Genome-Wide Association Studies (GWAS). A GWAS is briefly defined as a method that analyzes a large number of markers – distributed all over the genome – for association with a particular disease or condition by comparing relative frequencies between cases (individuals with the disease or condition) and controls (random non-disease individuals) (Fig. 3). In contrast to candidate gene association approach, a GWAS does not require a previous knowledge of the disease pathways and permits a scan of the genome in an unbiased way allowing the identification of novel susceptibility factors [51].

The development and completion of the Human Genome Project and the International Human Haplotype Map Project [52–54] in combination with important advances in the SNP genotyping technologies have positioned the GWAS as a very common method for identifying genes for diseases. In addition to these

Sample Selection/Collection

Case Selection
Homogeneity
Sample size for statistical power
Control Selection
No population stratification
No relatedness
Sample size for statistical power

Platform Selection

Marker Selection
Tag SNPs: LD-based design (*)
Random SNPs (*)
Combined design: Tag SNPs + random SNPs (*)
Functional SNPs (*)
Population specific SNPs (if possible, Axiom)

Coverage
CNV probes
Cost

Laboratory

Sample Processing
Quality Controls

Data Analysis and Biological Interpretation
Validation and Replication

Fig. 3. GWAS workflow (*) [89].

discoveries and technological progress, the considerable diminution of the cost per genotype in the last few years and the ability to process and analyze hundreds of samples at a time must be also taken into account to understand this success. In that sense, the most popular companies in SNP genotyping, Affymetrix and Illumina, have focused their main efforts not only on designing new and updated products but also on robotizing their protocols developing less time-consuming workflows and simplifying and minimizing sample manipulation.

Since 2005, when the first GWAS reported that a polymorphism in the complement factor H was associated with age-related macular degeneration [55], a large number of GWAS has been published among which it is worth pointing out the Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC) publication where 7 common diseases (bipolar disorder, coronary disease, Chron's disease, hypertension, rheumatoid arthritis, and type 1 and 2 diabetes) were evaluated [56]. Many other human genetic diseases, traits and conditions have been scanned by a GWA strategy, such as myocardial infarction, sudden cardiac arrest, cancer, schizophrenia, asthma and so on. This huge amount of information has motivated the creation of the National Human Genome Research Institute (NHGRI) Catalogue of Published Genome-Wide Association Studies (<http://www.genome.gov/gwastudies>) where researchers can find on line and updated information extracted for published GWAS [57].

Although the most common GWA strategies were strictly based on SNP genotyping, the publication of the copy number variation (CNV) structure of the human genome [58,59] and the recognition of their potential role in complex disease susceptibility have motivated an expansion of the GWAS to the CNV field [60–62].

Related with SCD, some GWAS studies have been published most of them focusing on finding common variation involved in ion channel and developmental genes in atrial and atrioventricular conduction as well as in susceptibility to atrial fibrillation and therefore responsible of cardiac sudden death [10,11,63,64] or simply searching for the genetic component of sudden cardiac arrest [65].

4.1. Affymetrix' solutions for GWAS

4.1.1. Affymetrix GeneChip Human Mapping Arrays

The family of GeneChip Human Mapping arrays – manufactured by Affymetrix – comprises products with a SNP density level that has increased from the 10,000 SNPs of the 10K array to 100K, 500K and 1 million SNPs. The 500K array set was made up of two arrays

with approximately 262,000 SNPs for the Nspl array and 238,000 represented on the Styl array. The SNPs included on this array set were selected from both public domain and the Perlegen SNP database based on accuracy, call rate and LD analysis in Caucasians, African-Americans and Asians. The content of this 500K array set was then unified to create a single array called Genome-wide Human SNP 5.0 array. The newest Affymetrix Genome-Wide Human SNP product, the 6.0 mapping array, has been design to offer a high physical genomic coverage of the human genome with a median inter-marker distance of 680 bases. It contains more than 1.8 markers of genetic variation including 906,000 SNPs and 946,000 probes for the detection of CNV. Half of the SNP content, approximately 482,000 SNPs, comes from the previous-generation Affymetrix mapping arrays which have been successfully used in many association studies [56,66,67]. The remaining 424,000 SNPs include tag SNPs from the International HapMap Project, better representation of SNPs on sexual chromosomes, mitochondrial SNPs, SNPs in recombination hotspots and new SNPs added to the SNP database (dbSNP) after completion of the previous 500K array. In addition to the SNP content, the 6.0 mapping array includes probes targeting 5677 known CN regions from the Toronto Database of Genomic Variants and more than 744,000 markers selected to enable the discovery of novel CNV (for details, <http://www.affymetrix.com>).

The Affymetrix Genome Wide Assay protocol starts with a digestion step of genomic DNA with the appropriate restriction enzyme (XbaI, Nspl or Styl, depending on the array type) to generate fragments of 200–1100 bp in size. These fragments are then ligated to adaptors specially designed to act as PCR primer sites to allow enrichment of these fragments via PCR. PCR products are purified using paramagnetic beads and fragmented to less than 200 bp using DNaseI. Fragmented DNA is end-labeled and hybridized to a GeneChip. Finally, the samples are washed, stained and scanned and the genotypes are calculated using algorithms and software that are specific to the different arrays (for details, <http://www.affymetrix.com>).

4.1.2. Axiom Genome-Wide Human Arrays

The Axiom Genotyping Solution is the newest Affymetrix genotyping system for GWAS, replication studies and candidate gene association studies. It includes specific array plates for Caucasian, Asian, and African populations, complete reagents kits, data analysis tools and end-to-end automated sample processing utilizing the GeneTitan-Multi-Channel Instrument in combination with the Beckman FX robot.

The Axiom Genome-Wide Human Array (Caucasian population) provides high genetic coverage in European population and contains more than 560,000 SNPs and more than 6000 biallelic indels from the dbSNP database. SNPs were selected to represent chromosomes X and Y, as well as mitochondrial SNPs, cSNPs, SNPs in recombination hotspots, ADME SNPs, miRNA SNPs, and disease-associated SNPs.

The Axiom Genome-Wide ASI Array (Asian population) provides high genetic coverage in Asian population and contains a total of 598,000 SNPs including SNPs in genic regions and in conserved regions, coding SNPs and X chromosome SNPs.

In the Axiom Genome-Wide Human assay, total genomic DNA is amplified and randomly fragmented into 25–125 bp fragments. These fragments are purified and re-suspended in hybridization cocktail that is then transferred to the Affymetrix GeneTitan instrument for automated, hands-free processing (including hybridization to Axiom array plates, staining, washing and imaging). Image files are automatically processed for automated allele calling and quality control with the Axiom GT1 algorithm available through the Affymetrix Genotyping Console Software v4.0 (for details, <http://www.affymetrix.com>).

4.2. Illumina's solutions for GWAS

In collaboration with the Wellcome Trust Sanger Institute, the Centre for Applied Genomics at the Hospital for Sick Children in Toronto, the BROAD Institute and the deCODE Genetics, Illumina has developed the Infinium BeadChip family of products that enables simultaneous interrogation of thousands (Human 610- and 660-Quad BeadChips) to more than 1 million markers (Human 1M-Duo DNA Analysis BeadChip and Human Omni1-Quad BeadChip).

The SNP selection strategy for this product line is mainly based on the information derived from the International Hap Map Project improving the power of association studies since that genotyping highly informative SNPs (tagSNPs) yields the same information as genotyping a larger number of randomly selected SNPs. In addition to these tagSNPs, BeadChip's content is supplemented with non-synonymous SNPs and, as well as Affymetrix Genome-Wide Arrays, markers for copy number variation assessment are also included on Illumina arrays.

The Human 1M-Duo DNA Analysis BeadChip interrogates more than 1.1 million markers per sample with a median inter-marker distance of 1.5 kb and yields high resolution CNV power detection and cytogenetics. It contains tagSNPs, SNPs in genes (both synonymous and non-synonymous SNPs), SNPs in the MHC region and SNPs in regions related to drug metabolism. SNPs and non-polymorphic markers in known and novel CNV regions are also included in this beadchip (for details, <http://www.illumina.com>).

The Human Omni1-Quad BeadChip interrogates nearly 1.2 million loci per sample in a four-sample format. This array includes strategically selected markers from all three HapMap phases and extensive disease-associated SNPs, including new data from the 1000 Genomes Project. Structural variation analysis is also possible with the Omni1-Quad arrays due to the content on CNVs and copy neutral variants (inversions and translocations) (for details, <http://www.illumina.com>).

The first version of the Infinium® Whole Genome Genotyping (WGG) Assay (Infinium I) was designed to interrogate 10,000–100,000 SNPs, whereas the latest Infinium II can be used to genotype more than 1 million assays. Both Infinium I and II are based on an isothermal whole genome-amplification (WGA) of the genomic DNA followed by a direct hybridization to a bead array of 50-mer locus specific primers. After hybridization, allelic discrimination is carried out on the array by an allelic specific primer extension (for Infinium I) or a single base extension (for Infinium II). Products are subsequently fluorescently stained by the incorporation of differently labelled terminator nucleotides, the fluorescence is detected by the Illumina BeadArray scanner and the genotypes are called using Illumina's software [68–70].

In addition to the approaches described for GWAS, Illumina has the HumanCVD BeadChip, the first high-density single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping standard panel specifically targeted for cardiovascular disease (CVD) studies. The BeadChip features nearly 50,000 markers that capture genetic diversity across approximately 2100 genes associated with CVD processes such as blood pressure changes, insulin resistance, metabolic disorders, dyslipidemia, and inflammation [71,72].

4.3. Exome sequencing

When there are not candidate genes or if the number of genes exceeds tens whole exome sequencing is a useful approach. This strategy can be achieved combining the use of NGS technologies with targeted enrichment methods. Both Nimblegen and Agilent have developed commercial kits for capturing all human exons.

This approach has been recently successfully used to determine the genetic basis of Miller syndrome, a recessive Mendelian

disorder [73] and Schinzel-Giedion syndrome, a dominant Mendelian disorder [74]. In the first study, two 244K Arrays for Agilent were used for capturing the exome and the sequence was performed on an Illumina platform. In the second study, Agilent SureSelect Human All Exon kit was used for enriching four exomes and their subsequent sequencing on a SOLiD system.

5. Discussion

Sudden cardiac death may be the first and last clinical presentation of several cardiomyopathies, so DNA analysis linked to pathologic autopsy in death cases and clinical evaluation in the case of living individuals may help to confirm a diagnosis. Moreover, after a suspected genetic disease death it should be imperative that the family is approached and offered genetic testing since genetic screening in family members can help to identify individuals at risk, enabling diagnosis and preventing complications [75–77].

Given the observation that one third of unexplained SD cases are of genetic origin, genetic analysis should become part of the routine postmortem study of SD with normal heart or heart having signals of genetic disease (i.e. hypertrophy and disarray). To this aim, proper sampling of blood and tissues has been recommended in the guidelines for autopsy investigation proposed by the Association for European Cardiovascular Pathology.

One of the main difficulties we have found so far in the study of genetics of sudden death is that when we try to do a search of possible genetic cause in a sufficient number of cases to be statistically representative, we have to resort to retrospective studies relying on cohorts already collected, most of them with Formalin Fixed, Paraffin Embedded Tissue (FFPE) samples with the consequent difficulties and hardships for its study.

Some of the mutation screening approaches using small amplicons for mutation detection have shown good results in the analysis of FFPE samples [78,79]. Specifically, Brion et al. [14], in their work on MassArray system applied to the study of SIDS have obtained very good results with paraffin-embedded material with a call rate of 80.62%. The rate obtained by Allegue et al. [13] in their study in the SCN5A gene, was slightly lower (65.58%), but only 17 samples were analyzed and the call rate for testing the same gene in EDTA blood samples was also slightly reduced, 74.35%.

Human Mapping Arrays require DNA digestion followed by PCR amplification to reduce genome complexity, so the use of FFPE samples is a handicap since they contain degraded DNA resulting in even shorter fragment lengths after digestion. Although genotyping efficiency and reliability are reduced for FFPE DNA when compared with fresh samples, several papers have been published revealing methods to improve performance at the expense of a variable reduction in resolution [80,81].

Despite the quality of FFPE samples, recent studies have also demonstrated the potential use of NGS technologies to interrogate FFPE samples [82,83].

Regardless of the strategy we choose for our genetic study it should always be taken into account the difficulties we face, not only at a technological level, but also regarding the characteristics of the disease itself, such as genetic heterogeneity (same phenotype caused by polymorphisms in different genes), allelic heterogeneity (same phenotype caused by different alleles at the same gene), epistasis (the effect of a genotype depends on the presence of another genotype), gene-environment interactions (the effect of a genotype depends on the presence of an environmental factor), phenotypic heterogeneity (variability in expressivity or clinical manifestations of a genetic disease), phenocopies (a phenotype that mimics the genetically caused phenotype of interest), among others.

According to Andersen et al. [84] and to AHA/ESC guidelines [85] consanguine first-degree relatives of HCM patients should be offered clinical screening and additional genetic screening, if the clinical diagnosis of death is not clearly established based on major diagnostic criteria, after an appropriate genetic counselling. If a disease-causing mutation has been identified, it should be emphasized that genetic screening is superior to clinical screening with respect to specificity of identification of family members at risk.

A recent study shows that the current cost of genetic testing for inherited cardiac channelopathies is reasonable for those who have a conclusive diagnosis and that these patients should have priority access to genetic screening [86]. But in those who only have a possible diagnosis or unexplained ventricular fibrillation (VF), the cost of genotyping could be prohibitive. Frequently, clinicians seek genetic testing in healthy people (i.e. sport teams) to exclude the presence of one of the genetic conditions that expose a patient to risk of sudden death, but unfortunately, this is a wrong indication for testing. As Bai et al. [86] study shows, only in a very few individuals in this group the mutation responsible can be found, but in those negative it is not possible to rule out the presence of the disease, as they may still carry mutations in unknown genes.

Although this is basically true, the situation could change in the near future thanks to the application of new technologies such as those presented here. On the one hand, association studies such as large-scale GWAS allow the identification of new genes responsible for the fatal effect that may be included in subsequent diagnostic tests. On the other hand, with the introduction of new technologies such as resequencing and specially the implementation of NGS, whole exome and large regions of interest will be sequenced at much lower cost than conventional sequencing, so looking for new mutations responsible for the death is becoming more and more affordable and effective.

Multidisciplinary teams that incorporate forensic pathologists, cardiologists, geneticists, and genetic counsellors are crucial for complete and comprehensive approach to sudden cardiac death cases, to be effective in the forensic, clinical and genetic investigations, to answer potential concerns and to approach the several remaining unknowns [78,87].

References

- [1] S. Sen-Chowdhry, W.J. McKenna, Sudden cardiac death in the young: a strategy for prevention by targeted evaluation, *Cardiology* 105 (2006) 196–206.
- [2] C. Basso, F. Calabrese, D. Corrado, G. Thiene, Postmortem diagnosis in sudden cardiac death victims: macroscopic, microscopic and molecular findings, *Cardiovasc. Res.* 50 (2001) 290–300.
- [3] H.L. Tan, N. Hoffman, I.M. van Langen, A.C. van der Wal, A.A. Wilde, Sudden unexplained death: heritability and diagnostic yield of cardiological and genetic examination in surviving relatives, *Circulation* 112 (2005) 207–213.
- [4] S.G. Priori, E. Aliot, C. Blomstrom-Lundqvist, et al., Task force on sudden cardiac death of the European society of cardiology, *Eur. Heart J.* 22 (2001) 1374–1450.
- [5] M.S. Rodriguez-Calvo, M. Brion, C. Allegue, L. Concheiro, A. Carracedo, Molecular genetics of sudden cardiac death, *Forensic Sci. Int.* 182 (2008) 1–12.
- [6] D.J. Tester, M.J. Ackerman, Cardiomyopathic and channelopathic causes of sudden unexplained death in infants and children, *Annu. Rev. Med.* 60 (2009) 69–84.
- [7] Genetic diagnostics and genetic counselling in hypertrophic cardiomyopathy (HCM), *Neth. Heart J.* 18 (2010) 144–159.
- [8] F.I. Marcus, W.J. McKenna, D. Sherrill, et al., Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: proposed modification of the task force criteria, *Circulation* 121 (2010) 1533–1541.
- [9] P.L. Hedley, P. Jorgensen, S. Schlamowitz, et al., The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a mutation update, *Hum. Mutat.* 30 (2009) 1486–1511.
- [10] A. Pfeuffer, S. Sanna, D.E. Arking, et al., Common variants at ten loci modulate the QT interval duration in the QTSCD Study, *Nat. Genet.* 41 (2009) 407–414.
- [11] C. Newton-Cheh, M. Eijgelsheim, K.M. Rice, et al., Common variants at ten loci influence QT interval duration in the QTGEN Study, *Nat. Genet.* 41 (2009) 399–406.
- [12] P. Oeth, G. del Mistro, G. Marnellos, T. Shi, D. van den Boom, Qualitative and quantitative genotyping using single base primer extension coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MassARRAY), *Methods Mol. Biol.* 578 (2009) 307–343.

- [13] C. Allegue, R. Gil, P. Sanchez-Diz, et al., A new approach to long QT syndrome mutation detection by Sequenom MassArray system, *Electrophoresis* 31 (2010) 1648–1655.
- [14] M. Brion, C. Allegue, L. Monserrat, et al., Large scale analysis of HCM mutations in sudden cardiac death, *Forensic Sci. Int.* (2008) 549–550.
- [15] A. Kurg, N. Tonisson, I. Georgiou, et al., Arrayed primer extension: solid-phase four-color DNA resequencing and mutation detection technology, *Genet. Test.* 4 (2000) 1–7.
- [16] K. Krjutskov, R. Andreson, R. Magi, et al., Development of a single tube 640-plex genotyping method for detection of nucleic acid variations on microarrays, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) e75.
- [17] C.H. Lin, J.M. Yeakley, T.K. McDaniel, R. Shen, Medium- to high-throughput SNP genotyping using VeraCode microbeads, *Methods Mol. Biol.* 496 (2009) 129–142.
- [18] I.V. Kutyavin, I.A. Afonina, A. Mills, et al., 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 655–661.
- [19] P.M. Holland, R.D. Abramson, R. Watson, D.H. Gelfand, Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (1991) 7276–7280.
- [20] L.G. Lee, C.R. Connell, W. Bloch, Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorescent probes, *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 3761–3766.
- [21] J.A. Hernesniemi, P.J. Karhunen, N. Oksala, et al., Interleukin 18 gene promoter polymorphism: a link between hypertension and pre-hospital sudden cardiac death: the Helsinki Sudden Death Study, *Eur. Heart J.* 30 (2009) 2939–2946.
- [22] Finishing the euchromatic sequence of the human genome, *Nature* 431 (2004) 931–945.
- [23] E.H. Turner, S.B. Ng, D.A. Nickerson, J. Shendure, Methods for genomic partitioning, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 10 (2009) 263–284.
- [24] L. Mamasova, A.J. Coffey, C.E. Scott, et al., Target-enrichment strategies for next-generation sequencing, *Nat. Methods* 7 (2010) 111–118.
- [25] M. Yeager, N. Xiao, R.B. Hayes, et al., Comprehensive resequencing analysis of a 136 kb region of human chromosome 8q24 associated with prostate and colon cancers, *Hum. Genet.* 124 (2008) 161–170.
- [26] R. Tewhey, J.B. Warner, M. Nakano, et al., Microdroplet-based PCR enrichment for large-scale targeted sequencing, *Nat. Biotechnol.* 27 (2009) 1025–1031.
- [27] P. Hardenbol, J. Baner, M. Jain, et al., Multiplexed genotyping with sequence-tagged molecular inversion probes, *Nat. Biotechnol.* 21 (2003) 673–678.
- [28] P. Hardenbol, F. Yu, J. Belmont, et al., Highly multiplexed molecular inversion probe genotyping: over 10,000 targeted SNPs genotyped in a single tube assay, *Genome Res.* 15 (2005) 269–275.
- [29] G.J. Porreca, K. Zhang, J.B. Li, et al., Multiplex amplification of large sets of human exons, *Nat. Methods* 4 (2007) 931–936.
- [30] E.H. Turner, C. Lee, S.B. Ng, D.A. Nickerson, J. Shendure, Massively parallel exon capture and library-free resequencing across 16 genomes, *Nat. Methods* 6 (2009) 315–316.
- [31] T.J. Albert, M.N. Molla, D.M. Muzny, et al., Direct selection of human genomic loci by microarray hybridization, *Nat. Methods* 4 (2007) 903–905.
- [32] E. Hodges, Z. Xuan, V. Balija, et al., Genome-wide in situ exon capture for selective resequencing, *Nat. Genet.* 39 (2007) 1522–1527.
- [33] D.T. Okou, K.M. Steinberg, C. Middle, et al., Microarray-based genomic selection for high-throughput resequencing, *Nat. Methods* 4 (2007) 907–909.
- [34] S.B. Ng, E.H. Turner, P.D. Robertson, et al., Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes, *Nature* 461 (2009) 272–276.
- [35] S. Bau, N. Schracke, M. Kranzle, et al., Targeted next-generation sequencing by specific capture of multiple genomic loci using low-volume microfluidic DNA arrays, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 171–175.
- [36] D. Summerer, H. Wu, B. Haase, et al., Microarray-based multicystic-enrichment of genomic subsets for targeted next-generation sequencing, *Genome Res.* 19 (2009) 1616–1621.
- [37] A. Gnirke, A. Melnikov, J. Maguire, et al., Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing, *Nat. Biotechnol.* 27 (2009) 182–189.
- [38] D. Dressman, H. Yan, G. Traverso, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 8817–8822.
- [39] C. Adessi, G. Matton, G. Ayala, et al., Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) E87.
- [40] M. Fedurco, A. Romieu, S. Williams, I. Lawrence, G. Turcatti, BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) e22.
- [41] M. Margulies, M. Egholm, W.E. Altman, et al., Genome sequencing in microfabricated high-density picoliter reactors, *Nature* 437 (2005) 376–380.
- [42] M. Ronaghi, S. Karamohamed, B. Pettersson, M. Uhlen, P. Nyren, Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release, *Anal. Biochem.* 242 (1996) 84–89.
- [43] G. Turcatti, A. Romieu, M. Fedurco, A.P. Tairi, A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) e25.
- [44] A. Valouev, J. Ichikawa, T. Tonthat, et al., A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning, *Genome Res.* 18 (2008) 1051–1063.
- [45] I. Braslavsky, B. Hebert, E. Kartalov, S.R. Quake, Sequence information can be obtained from single DNA molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 3960–3964.
- [46] D. Pushkarev, N.F. Neff, S.R. Quake, Single-molecule sequencing of an individual human genome, *Nat. Biotechnol.* 27 (2009) 847–852.
- [47] E.A. Ashley, A.J. Butte, M.T. Wheeler, et al., Clinical assessment incorporating a personal genome, *Lancet* 375 (2010) 1525–1535.
- [48] D.G. Wang, J.B. Fan, C.J. Siao, et al., Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome, *Science* 280 (1998) 1077–1082.
- [49] S. Waldmuller, M. Muller, K. Rackebandt, et al., Array-based resequencing assay for mutations causing hypertrophic cardiomyopathy, *Clin. Chem.* 54 (2008) 682–687.
- [50] S. Fokstuen, R. Lyle, A. Munoz, et al., A DNA resequencing array for pathogenic mutation detection in hypertrophic cardiomyopathy, *Hum. Mutat.* 29 (2008) 879–885.
- [51] C.S. Carlson, M.A. Eberle, L. Kruglyak, D.A. Nickerson, Mapping complex disease loci in whole-genome association studies, *Nature* 429 (2004) 446–452.
- [52] The International HapMap Project, *Nature* 426 (2003) 789–796.
- [53] A haplotype map of the human genome, *Nature* 437 (2005) 1299–1320.
- [54] K.A. Frazer, D.G. Ballinger, D.R. Cox, et al., A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs, *Nature* 449 (2007) 851–861.
- [55] R.J. Klein, C. Zeiss, E.Y. Chew, et al., Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration, *Science* 308 (2005) 385–389.
- [56] Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3000 shared controls, *Nature* 447 (2007) 661–678.
- [57] L.A. Hindorf, P. Sethupathy, H.A. Jinkins, et al., Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (2009) 9362–9367.
- [58] R. Redon, S. Ishikawa, K.R. Fitch, et al., Global variation in copy number in the human genome, *Nature* 444 (2006) 444–454.
- [59] J.L. Freeman, G.H. Perry, L. Feuk, et al., Copy number variation: new insights in genome diversity, *Genome Res.* 16 (2006) 949–961.
- [60] S.A. McCarrill, D.M. Altshuler, Copy-number variation and association studies of human disease, *Nat. Genet.* 39 (2007) 537–542.
- [61] S.A. McCarrill, Extending genome-wide association studies to copy-number variation, *Hum. Mol. Genet.* 17 (2008) R135–R142.
- [62] N. Craddock, M.E. Hurles, N. Cardin, et al., Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3000 shared controls, *Nature* 464 (2010) 713–720.
- [63] I.M. Nolte, C. Wallace, S.J. Nevehouse, et al., Common genetic variation near the phospholamban gene is associated with cardiac repolarisation: meta-analysis of three genome-wide association studies, *PLoS One* 4 (2009) e6138.
- [64] A.L. George Jr., Common genetic variants in sudden cardiac death, *Heart Rhythm* 6 (2009) 53–59.
- [65] D.E. Arking, K. Reinier, W. Post, et al., Genome-wide association study identifies GPC5 as a novel genetic locus protective against sudden cardiac arrest, *PLoS One* 5 (2010) e8979.
- [66] Y. Gu, I.T. Harley, L.B. Henderson, et al., Identification of IFRD1 as a modifier gene for cystic fibrosis lung disease, *Nature* 458 (2009) 1039–1042.
- [67] T. Yoshida, K. Kato, K. Yokoi, et al., Association of genetic variants with myocardial infarction in Japanese individuals with different lipid profiles, *Int. J. Mol. Med.* 25 (2010) 607–616.
- [68] F.J. Steemers, K.L. Gunderson, Whole genome genotyping technologies on the BeadArray platform, *Biotechnol. J.* 2 (2007) 41–49.
- [69] K. Maresca, U. Broeckel, Genotyping platform for mass-throughput genotyping with SNPs, including human genome-wide scans, *Adv. Genet.* 60 (2008) 107–139.
- [70] J. Earl, W. Greenhalf, Single-nucleotide polymorphism (SNP) analysis to associate cancer risk, *Methods Mol. Biol.* 576 (2010) 171–196.
- [71] P.J. Talmud, F. Drenos, S. Shah, et al., Gene-centric association signals for lipids and apolipoproteins identified via the HumanCVD BeadChip, *Am. J. Hum. Genet.* 85 (2009) 628–642.
- [72] S.E. Humphries, F. Drenos, G. Ken-Dror, P.J. Talmud, Coronary heart disease risk prediction in the era of genome-wide association studies: current status and what the future holds, *Circulation* 121 (2010) 2235–2248.
- [73] S.B. Ng, K.J. Buckingham, C. Lee, et al., Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder, *Nat. Genet.* 42 (2010) 30–35.
- [74] A. Hoischen, B.W. van Bon, C. Gillissen, et al., De novo mutations of SETBP1 cause Schinzel-Giedion syndrome, *Nat. Genet.* 42 (2010) 483–485.
- [75] K.Y. van Spaendonck-Zwarts, M.P. van den Berg, J.P. van Tintelen, DNA analysis in inherited cardiomyopathies: current status and clinical relevance, *Pacing Clin. Electrophysiol.* 31 (Suppl. 1) (2008) S46–S49.
- [76] C. Basso, E. Carturan, K. Pilichou, et al., Sudden cardiac death with normal heart molecular autopsy, *Cardiovasc. Pathol.* (2010). Epub ahead of print.
- [77] A. Oliva, R. Brugada, E. D'Alloja, et al., State of the art in forensic investigation of sudden cardiac death, *Am. J. Forensic Med. Pathol.* (2010). Epub ahead of print.
- [78] V. Kotoula, E. Charalambous, B. Biesmans, et al., Targeted KRAS mutation assessment on patient tumor histologic material in real time diagnostics, *PLoS One* 4 (2009) e7746.
- [79] E.H. Lips, J.W. Dierssen, R. van Eijk, et al., Reliable high-throughput genotyping and loss-of-heterozygosity detection in formalin-fixed, paraffin-embedded tumors using single nucleotide polymorphism arrays, *Cancer Res.* 65 (2005) 10188–10191.
- [80] M. Tuffeffer, A. De Bondt, I. Van Den Wyngaert, et al., Genome-wide copy number alterations detection in fresh frozen and matched FFPE samples using SNP 6.0 arrays, *Genes Chromosomes Cancer* 47 (2008) 957–964.
- [81] J. Oosting, E.H. Lips, R. van Eijk, et al., High-resolution copy number analysis of paraffin-embedded archival tissue using SNP BeadArrays, *Genome Res.* 17 (2007) 368–376.

- [82] H.M. Wood, O. Belvedere, C. Conway, et al., Using next-generation sequencing for high resolution multiplex analysis of copy number variation from nanogram quantities of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded specimens, *Nucleic Acids Res.* (2010), Epub ahead of print.
- [83] M.R. Schweiger, M. Kerick, B. Timmermann, et al., Genome-wide massively parallel sequencing of formaldehyde fixed-paraffin embedded (FFPE) tumor tissues for copy-number- and mutation-analysis, *PLoS One* 4 (2009) e5548.
- [84] P.S. Andersen, O. Havndrup, L. Hougs, et al., Diagnostic yield, interpretation, and clinical utility of mutation screening of sarcomere encoding genes in Danish hypertrophic cardiomyopathy patients and relatives, *Hum. Mutat.* 30 (2009) 363–370.
- [85] B.J. Maron, W.J. McKenna, G.K. Danielson, et al., American College of Cardiology/ European Society of Cardiology clinical expert consensus document on hypertrophic cardiomyopathy. A report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines, *J. Am. Coll. Cardiol.* 42 (2003) 1687–1713.
- [86] R. Bai, C. Napolitano, R. Bloise, N. Monteforte, S.G. Priori, Yield of genetic screening in inherited cardiac channelopathies: how to prioritize access to genetic testing, *Circ. Arrhythm Electrophysiol.* 2 (2009) 6–15.
- [87] O. Campuzano, P. Beltran-Alvarez, A. Iglesias, et al., Genetics and cardiac channelopathies, *Genet. Med.* 12 (2010) 260–267.
- [88] P.D. Stenson, M. Mort, E.V. Ball, et al., The human gene mutation database: 2008 update, *Genome Med.* 1 (2009) 13.
- [89] J.C. Barrett, L.R. Cardon, Evaluating coverage of genome-wide association studies, *Nat. Genet.* 38 (2006) 659–662.

2. Bloque 2:

2.1. Diseño de estrategia de análisis de variantes genéticas implicadas en MCH.

El trabajo aquí presentado se desarrolló en el marco de un convenio de colaboración entre el Grupo de Medicina Xenómica de la Universidad de Santiago de Compostela y el grupo de cardiología del entonces llamado Hospital Juan Canalejo, hoy Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña, para el desenvolvimiento de un proyecto de investigación de cara al diagnóstico genético de la miocardiopatía hipertrófica familiar. De este modo, se seleccionaron las variantes genéticas que, según la bibliografía e investigaciones previas, estaban implicadas en el desarrollo de la MCH y se diseñó una estrategia para abordar el estudio genético de dichas variantes a partir de ADN extraído de muestras de sangre de pacientes. La plataforma de genotipado elegida fue Sequenom MassARRAY® System de Sequenom debido a su gran efectividad y flexibilidad, que permite la adición de nuevas variantes genéticas a medida que se describen.

La colaboración entre ambos grupos de investigación permitió disponer de un prototipo inicial que incluía 502 mutaciones relacionadas con la MCH. Esto dio lugar a la formalización de un Contrato de Licencia de Explotación estableciendo las condiciones para la transferencia del conocimiento que facultase a la empresa *Health in Code* para la gestión técnica, producción industrial y comercialización de los productos derivados del proyecto en colaboración.

Finalmente, este prototipo inicial fue actualizado con nuevas mutaciones y desarrollos tecnológicos y actualmente incluye un total de 680 variantes genéticas distintas que pueden ser tipadas en 48 horas. Como hemos dicho, estudiamos ocho variantes genéticas por duplicado distribuidas en diferentes plexes a modo de control del genotipado.

El número de variantes genéticas incluidas en cada uno de los genes seleccionados para el diseño de la estrategia MCH puede verse en la tabla 19 adjunta.

Gen	Número de variantes incluidas
MYH7	279
MYBPC3	249
MYL2	14
MYL3	6
TNNT2	43
TNNI3	35
TNNC1	4
TPM1	14
ACTC	10
TTN	10
MYH6	6
PRKAG2	4
TCAP	3
GLA	1
MYO6	1
MYLK2	1

Tabla 19: Número de variantes genéticas en cada gen incluidas en la estrategia MCH en Sequenom MassARRAY® System.

Las 688 variantes genéticas se distribuyen en 44 ensayos tal y como se muestra en la tabla 20.

Número de ensayos	Número de variantes incluidas
1	23
2	22
3	21
4	20
3	19
3	18
5	17
7	16
3	15
1	14
3	13
2	12
1	11
1	10
1	8
1	7
1	5
1	4
1	3

Tabla 20: Distribución de las 688 variantes en ensayos para la estrategia de detección de variantes implicadas en MCH.

Para la validación de la estrategia de detección de variantes genéticas se genotiparon en la plataforma un total de 1442 muestras de pacientes afectos de MCH y de familiares para 594 de las variantes. Se detectaron 316 variantes genéticas en ocho de los genes incluidos en 288 de las muestras: 28 variantes en MYH7 en 94 muestras; 29 variantes en MYBPC3 en 127 muestras; cinco variantes en TNNT2 en 16 muestras; 6 variantes en TNNI3 en 13 muestras y una variante en ACTC, MYH6, MYLK2 y TPM1 (Figura 20).La tasa de éxito de genotipado obtenida fue de un 94,53%.

Todas las variantes detectadas fueron confirmadas por secuenciación directa tal y como se explicó en el apartado correspondiente de material y métodos de la presente tesis.

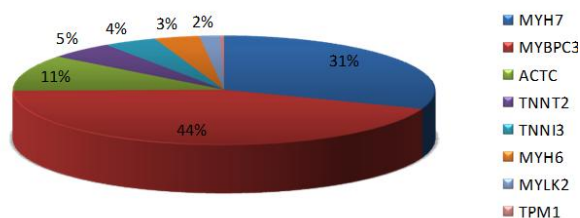


FIGURA 20: Variantes genéticas detectadas en la validación de la estrategia de detección de variantes genéticas implicadas en MCH.

Cabe citar que, de entre las 288 muestras con variantes mutadas, 32 muestras (11%) mostraron una mutación adicional, en el mismo gen o en otro gen diferente. Catorce de las muestras fueron heterocigotos dobles, 15 heterocigotos compuestos y tres de ellos fueron homocigotos mutados para una variante genética determinada (Figura 21).

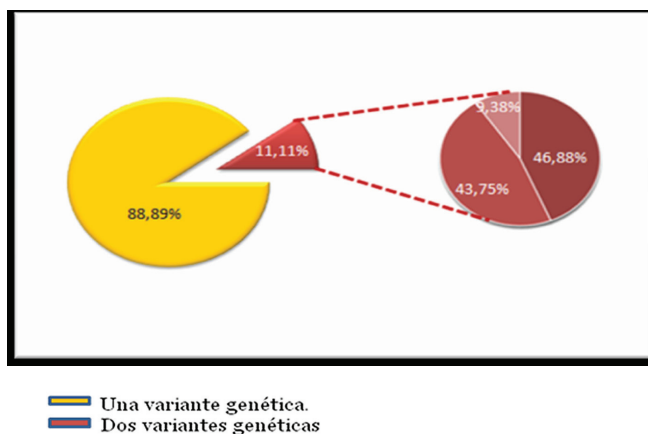


FIGURA 21: Representación de las mutaciones detectadas en la validación de variantes genéticas en MCH. Se detectó una variante genética en casi un 89% de los casos, en un 11% se detectaron dos variantes genéticas. De éstas un 43,75% eran heterocigotos dobles; un 46,88% heterocigotos compuestos y un 9,38% la variante se detectó en homocigosis.

Resumiendo: la metodología empleada consiste en la detección de variantes descritas por medio de la plataforma de genotipado. En aquellas muestras en que se detectó una variante, ésta se confirmó por secuenciación directa y se informó. En aquellos casos en que no se detectó variante genética en la plataforma de genotipado, se procedió a la secuenciación directa de los genes implicados en el desarrollo de MCH en el grupo de la Universidad de A Coruña. En estos casos se pueden detectar mutaciones *de novo* que pueden ser incluidas en los nuevos diseños en la plataforma.

El análisis del total de 688 variantes genéticas fue validado en 457 muestras que incluían afectos de MCH y familiares, casos con antecedentes personales o familiares de MSC y casos de SMSL.

Esta estrategia demostró ser adecuada para un amplio espectro de muestras, no sólo de ADN extraído de sangre periférica fresca sino también de ADN extraído de muestras de tejido o sangre recogida tras la autopsia y de ADN extraído de tejido embebido en parafinas, conservado en formol y en distintos grados de degradación. Así, la tasa de éxito de genotipado obtenida para el total de las 457 muestras fue de 86,25% y cuando seleccionamos únicamente las muestras de los casos de SMSL, todas ellas procedentes de tejido embebido en parafina, el éxito de genotipado sólomente se reduce un punto, 85,67%.

2.2. Artículo 3: A new approach to long QT syndrome mutation detection by Sequenom MassARRAY® system.

En este artículo publicado en la revista Electrophoresis se recoge la estrategia desarrollada para abordar el estudio genético de las variantes descritas en el desarrollo de LQT1, LQT2, LQT3 y SBr, patologías que pueden cursar con arritmias ventriculares polimórficas, síncope recurrente o muerte súbita.

Se desarrollaron tres test diagnósticos en la plataforma Sequenom MassARRAY® System: un test para detección de variantes detectadas en LQT1, en que se analizan variantes genéticas en el gen KCNH1; otro para LQT2, en que se incluyen variantes genéticas descritas en KCNH2 y un tercero para variantes genéticas implicadas en el desarrollo de LQT3 y SBr, en el que se analizan variantes genéticas en el gen SCN5A. Son los genes con mayor prevalencia de mutaciones implicadas en el desarrollo de estas canalopatías. Se analizaron 433 variantes genéticas distribuidas en 38 ensayos en 502 muestras de individuos con diferentes condiciones clínicas e historias familiares. La proporción de muestras para las que se obtuvo genotipo fue de 93%, 83% y 73% en KCNQ1, KCNH2 y SCN5A respectivamente.

El resultado de este estudio permite la validación de la plataforma de genotipado a gran escala en la detección de variantes genéticas en estos tres genes. Todas las variantes detectadas fueron confirmadas por secuenciación directa.

Pese a que el número de genes y variantes genéticas implicadas en el desarrollo del SQT y SBr están en continuo aumento, la mayor parte de las variantes genéticas asociadas al desarrollo de la patología se han descrito en KCNQ1, KCNH2 y SCN5A, de modo que la detección de variantes que, como hemos dicho puede ser actualizada, en estos genes es una estrategia adecuada para el estudio inmediato de mutaciones descritas. Sin embargo, se debe tener en cuenta que las nuevas tecnologías de NGS son ya una realidad y que permiten la secuenciación completa de los genes en estudio de forma rápida. De este modo, se convierten en una estrategia adecuada para el estudio de esta patología, en la que muchas de las mutaciones descritas son familiares. Se han descrito variantes en otros genes en los que todavía es demasiado pronto para establecer la frecuencia.

Catarina Allegue^{1,2}
 Rocio Gil^{1,3}
 Paula Sanchez-Diz¹
 María Torres^{1,3}
 Inés Quintela^{1,3}
 Angel Carracedo^{1,3}
 María Brión^{1,2}

¹Genomics Medicine Group,
 Galician Foundation of Genomic
 Medicine and University of
 Santiago de Compostela,
 CIBERER Santiago de
 Compostela, Spain

²Genetics of Cardiovascular and
 Ophthalmologic Diseases,
 Complejo Hospitalario
 Universitario de Santiago, IDIS,
 Santiago de Compostela, Spain

³National Genotyping Center,
 University of Santiago de
 Compostela, Santiago de
 Compostela, Spain

Received November 13, 2009

Revised February 16, 2010

Accepted February 17, 2010

Research Article

A new approach to long QT syndrome mutation detection by Sequenom MassARRAY[®] system

Congenital long QT syndrome is an inherited cardiac disorder characterized by a prolonged QT interval and polymorphic ventricular arrhythmias that could result in recurrent syncope, seizures or sudden death as the most dramatic event. Until now QT interval mutations have been described in 12 genes, where the majority of mutations reside in three genes KCNQ1, KCNH2, and SCN5A. Diagnosis and prognosis are directly related with the gene and mutation involved. We have developed a diagnostic approach for long QT syndrome and Brugada syndrome based on published mutations and Sequenom MassARRAY[®] system. Three diagnostic tests have been developed, oriented to each of the three most prevalent genes in the long QT syndrome. A total of 433 mutations are analyzed in 38 multiplex reactions, allowing their detection in about 48 h. Tests were validated on 502 samples from individuals with different clinical conditions and family history. The average call rates obtained for each of the tests were 93, 83, and 73% in KCNQ1, KCNH2, and SCNA, respectively. Sequenom MassARRAY mutation detection is a reliable, highly flexible, and cost-efficient alternative to conventional methods for genetic testing in long QT syndrome and Brugada syndrome, facilitating flexible upgrades of the version of the test presented here with the inclusion of new mutations.

Keywords:

Brugada syndrome / Cardiac disorders / Genetic disorders / Long QT syndrome / Mutation detection
 DOI 10.1002/elps.201000022

1 Introduction

Sudden cardiac death (SCD) is considered as one of most common causes of death in developed countries, representing a major health problem. The incidence of SCD is 30–200/100 000 people each year [1]. It is considered that SCDs do occur when the cause of the death remains unexplained after completion of the gross and microscopic autopsy, an adequate histology of the heart (no structural abnormality is found), and toxicology screening. It has been described that the cause of death cannot be found in at least 10%, and perhaps up to 30% of the sudden deaths after

postmortem investigation and it was suggested that a considerable number of these sudden deaths may be associated with heritable channelopathies [2, 3].

Long QT syndrome (LQTS), short QT syndrome, Brugada syndrome (BrS), and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, all of them are arrhythmia disorders generally associated with a structurally normal heart. Congenital forms of these diseases are caused by mutations in the genes encoding defective ionic channel proteins that govern cell membrane transit of sodium, potassium, and calcium ions that, in many cases, are the molecular target for almost all drugs that cause the acquired form of LQTS [4]. In catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, mutations occur in key components of intracellular calcium-induced calcium release from the sarcoplasmic reticulum.

Although defects in the ion channels of the myocyte do not lead to morphological abnormality in the heart, it is thought that these defects can explain electrocardiogram (ECG) abnormalities, rhythm disturbances, and an increased risk of sudden death as the most severe clinical manifestation [5].

LQTS includes a distinct group of cardiac channelopathies which course with QTc interval prolongation in

Correspondence: Dr. María Brión, Institute of Legal Medicine, San Francisco s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain
E-mail: maria.brion@usc.es
Fax: +36981580336

Abbreviations: BrS, Brugada syndrome; ECG, electrocardiogram; ICD, implantable cardioverter-defibrillator; LQTS, long QT syndrome; SAP, shrimp alkaline phosphatase; SCD, sudden cardiac death; SIDS, sudden infant death syndrome

ECG, myocardium repolarization fails, a specific form of polymorphic ventricular tachycardia called Torsade des Pointes, and higher risk for syncope, seizure and SCDs [6]. A patient with a QTc value of 550 ms will have a 63% higher risk of cardiac events than a patient with a QTc value of 450 ms. It is a genetically heterogeneous disease that affects 1:3 000–1:5 000 persons. About 85% are found as inherited and 15% are sporadic cases [7].

Two patterns of inheritance have been described in LQTS: a rare autosomal recessive disease (Jervell and Lange-Nielsen syndrome) which is associated with deafness and the autosomal dominant form which is much more common (Romano-Ward syndrome). Phenotypic expression is heterogeneous and covers from sudden death in infancy to asymptomatic longevity [8]. The genetic heterogeneity of the disease complicates the study of each case. Since 1991 when first mutation was described [9], many mutations have been described in 12 genes (Table 1). Most of the mutations, almost 800, have been described in three main genes: KCNQ1, KCNH2, and SCN5A with a frequency in the affected people of 30–35, 25–30, and 5–10%, respectively [10]. Loss-of-function mutations in the KCNQ1 and KCNH2 genes cause LQT1 and LQT2 syndromes, respectively, while gain-of-function mutations in the SCN5A genes cause LQT3 syndrome.

The ECG pattern in the BrS is characterized by ST elevation in the right precordial leads V1–3 and it also represents an increased risk of sudden death [11]. It shows an autosomal dominant inheritance and the penetrance and expressivity is highly variable. Until now, most of the mutations (approximately 20% of BrS cases) have been described in the SCN5A gene (loss-of-function mutations), and patients were classified as BrS type 1. Recently, new

mutations have been described in additional genes implicated in the modulation of the sodium channel function.

The short QT syndrome has been recognized recently as a separate clinical entity [12]. The clinical picture consists of sudden death, syncope, palpitations, and proximal atrial fibrillation. To date, gain of function mutations in the KCNH2, KCNQ1, and KCNJ2 genes have been identified as pathogenic substrates [13].

Although recent years have brought considerable progress in our understanding of the genetic causes of channelopathies, the stratify risk of SCD in individual patients remains being a challenge, making it difficult for the clinicians to determine the appropriate therapy, as β -blocker therapy or implantable cardioverter-defibrillator, and making it difficult for the forensic experts to determine the cause of death in those cases triggered by a sudden death. Indicators of high risk include a personal history of aborted SCD or syncope, excessive QT prolongation, age and gender, and genotype [14].

Since mutation detection by classical serial molecular techniques like direct sequencing is time consuming and expensive, our principal aim was to develop a cost-effective diagnostic strategy that allowed a rapid screening. We have used a rapid and efficient mutation detection system based on semiautomated MALDI-TOF-MS by means of Sequenom MassARRAY[®] system which uses iPLEX GOLD reactions to detect mutations. Described mutations for the three most prevalent genes associated with channelopathies (KCNQ1, GenBank: AF000571; KCNH2, GenBank: U04270; SCN5A, GenBank: AJ310893) were selected and analyzed. Results from a total of 502 individuals including SCD cases, arrhythmic affected people, and healthy people are

Table 1. Genes involved in cardiac channelopathies

Phenotype	Gene	Locus	Protein coding	Frequency in patients (%)
LQTS1	KCNQ1	11p15.5	Kv7.1	30–35%
LQTS2	KCNH2	7q35–36	Kv11.1	25–30%
LQTS3	SCN5A	3p21–p24	NaV1.5	5–10%
LQTS4	ANKB	4q25–q27	Ankyrin B	Rare
LQTS5	KCNE1	21q22.1	MinK	Rare
LQTS6	KCNE2	21q22.1	MiRP1	Rare
LQTS7	KCNJ2	17q23	Kir 2.1	Rare
LQTS8	CACNA1C	12p13.3	L-type calcium channel	Rare
LQTS9	CAV3	3p25	Caveolin-3	Rare
LQTS10	SCN4B	11q23.3	Sodium channel β 4	Rare
LQTS11	AKAP9	7q21–q22	Yotiao	Rare
LQTS12	SNTA1	20q11.2	Syntrophin- α 1	Rare
BrS1	SCN5A	3p21–p24	NaV1.5	20–30%
BrS2	GPD1L	3p24	G3PD1L	Rare
BrS3	CACNA1C	12p13.3	L-type calcium channel	?
BrS4	CACNB2	10p12.33	L-type calcium channel β 2 subunit	?
BrS5	SCN1B	19q13.1	Sodium channel β 1	?
BrS6	KCNE3	11q13–q14	MiRP2	?
BrS7	SCN3B	11q23.3	Sodium channel β 3	?

presented and the potential application of this new diagnostic strategy is discussed.

2 Material and methods

2.1 Samples

We have analyzed 502 unrelated individuals of Caucasian origin. The analyzed samples include general population recruited from primary health care (regardless of the QT interval), patients who suffered a sudden unexpected death (adult and infant cases) and the cause of death could not be explained after the autopsy, and patients who suffered syncope or seizure and have a familiar history of sudden death. The study also includes patients who had recuperated after a sudden cardiac event such as fibrillation that could have resulted in a SCD. In some cases, patients had received a discharge of their implantable cardioverter-defibrillator.

Individuals included in the study were classified into five different categories (Supporting Information Table 1): (i) 412 individuals from primary health care; (ii) 39 index cases with a prolonged QT interval in ECG, diagnosed with LQTS without specifying the subtype; (iii) 5 specific cases of LQTS diagnosed in ECG; (iv) 17 cases of sudden infant death syndrome (SIDS); (v) and 29 cases diagnosed for BrS.

All the patients were evaluated and diagnosed by cardiologists and forensic scientists following the standard

procedures [7, 15, 16]. This study was conducted according to the recommendations of the Declaration of Helsinki and approved by the local ethics committees of the participating institutions. Signed informed consent was obtained from all the subjects before their inclusion in the study.

2.2 DNA extraction

DNA was extracted from peripheral fresh blood by using the Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation). With frozen blood or other tissues collected after autopsy of deceased individuals phenol-chloroform protocol was used. DNA from tissue preserved in paraffin blocks was extracted after proteinase K digestion and subsequently purified by using centrifugal filter devices (Amicon Ultra, Millipore).

2.3 Mutation selection

Mutation selection in main implicated genes (KCNQ1, KCNH2, and SCN5A) was made by using the Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.org/>). At present, we have selected a total of 433 mutations that are shown in Figs. 1–3. Most of the selected mutations, almost 79%, are single nucleotide substitutions causing missense or nonsense codons, 5% are splicing mutations, and the

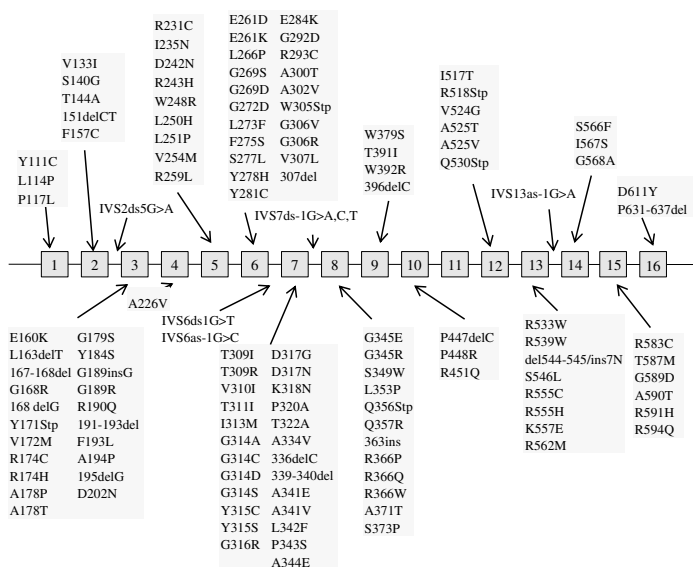


Figure 1. Positions of genetic variants within the KCNQ1 gene for which MassARRAY assays have been designed. Although 151 genetic variants have been analyzed, the figure only shows 135, which represent nucleotide changes in intronic regions and amino acid changes in exonic regions, which may be due to different nucleotide genetic variants.

2.4 Assay design

To design both PCR and MassEXTEND[®] primers for multiplexed assays, we used the MassARRAY assay design 3.1 (Sequenom). Since some of the mutations share the flanking regions, the 433 mutations were analyzed in 382 amplicons. The distribution of the amplicons in multiplex reactions is shown in Supporting Information Table 2.

To unify the PCR conditions, all the PCR primers had a common tag sequence at their 5' end (ACGTTGGATG). In the case of extension primers, each primer had attached at its 5' end, varying lengths of nonhomologous tails to create a difference large enough to analyze the spectrometer results. The PCR and extension primers are shown in Supporting Information Table 3.

2.5 Mutation detection

PCR amplifications were performed following manufacturer's recommendations [19]. We used 40 ng DNA from each sample, 1X PCR buffer (2 mM), MgCl₂ 2 mM, dNTPs 500 μM, 100 nM of each PCR primer, and 0.5 U of HotStar Taq[®]. Total volume of PCR reaction was 5 μL.

PCR protocol consists of 1 cycle of 4 min at 94°C; 45 cycles of 20 s at 94°C, 30 s at 56°C, and 1 min at 72°C; and 1 cycle of 3 min at 72°C.

After PCR, shrimp alkaline phosphatase (SAP) enzyme treatment is performed to dephosphorylate the dNTPs unincorporated in the PCR. Total volume of SAP reaction is 7 μL, including 5 μL of PCR product, 0.3 U of SAP enzyme, and 10X SAP buffer. Reaction mixture is then incubated in a standard thermocycler at 37°C for 40 min and 85°C for 5 min.

Following SAP treatment, iPLEX GOLD reaction is performed. Extension primer concentration for each mutation is shown in Supporting Information Table 3. Final iPLEX cocktail mix volume is 9 μL, including 10X iPLEX buffer, 1X iPLEX extension mix, 7 μM and 14 μM of primer mix (doubled concentration of the high mass primers relative to the low mass primers), and 1X iPLEX enzyme.

The iPLEX reaction is programmed at the thermocycler as follows: I: 94°C 30 s, II: 94°C for 5 s, III: 52°C for 5 s, IV: 80°C for 5 s, V: go to III 4 more times, VI: go to II 39 more times, VII: 72°C for 3 min. To optimize mass spectrometric analysis, a clean resin kit must be added to desalt the iPLEX reaction products. Then, the reaction products are dispensed onto a 384-element SpectroCHIP bioarray using the MassARRAY Nanodispenser.

Mass differences in the extension primers after the extension reaction are detected with MALDI-TOF-MS. Depending on the ddNTP added in the extension reaction, the mass of the extended sequence will be different (Supporting Information Table 4), and it will be detected in the MALDI-TOF-MS.

Typer analyzer v4.0.2 software (Sequenom) identifies the SNP-specific peaks according to their expected masses and automatically assigns the genotype calls.

To handle, retrieve, transform, and analyze the genetic data generated by the genotyping platform we have used SNPator (<http://www.snparator.com>), which has been developed in the context of the CeGen (Spain's National Genotyping Center), and INB (National Institute for Bioinformatics).

2.6 Sequencing

All the mutations detected with the MassARRAY system were confirmed by direct sequencing by using BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Detection was performed in a 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems) and analyzed by means of SeqScape v2.5 (Applied Biosystems).

3 Results

To evaluate the performance of the MassARRAY system adapted to the LQTS mutation detection, several genotyping rates were calculated. After the analysis of the 38 multiplex reactions, we obtain a pass rate, defined as the percentage of mutations included at the design in which we obtained the results, of 95.24, 91.41 and 79% in KCNQ1, KCNH2, and SCNA, respectively. Conversion rate, defined as the percentage value of the number of mutations that were added at the design and results could be obtained, was 87, 82, and 78% in KCNQ1, KCNH2, and SCNA, respectively. The average of genotyped samples that is the quotient between the total number of genotypes given and the total number of genotypes expected in percentage, was called call rate, and the values we have obtained were 93, 83, and 73% in KCNQ1, KCNH2, and SCNA, respectively.

Although the same DNA concentration was used for all the samples analyzed (2 μL of DNA concentrated at 20 ng/μL for each assay), the quality of the results was directly related to the origin and type of sample, getting the best results for those samples collected in health facilities directly from patients and sent for DNA extraction faster, and getting the worst results in the samples collected from SIDS cases, more prone to degradation.

Although results are generally worse for SCN5A study, one possible explanation is that the number of samples analyzed in this case is lower than in KCNQ1 and KCNH2, and they have in general more reduced DNA quality than the general healthy population analyzed for LQT1 and LQT2 genes and not included for the SCN5A test. In addition, the number of samples recruited from deaths represents 18% (17 samples from SIDS cases), which represents samples with poorer quality yet.

A total of eight genetic variants were detected among the analyzed samples (Table 2), three of them were relatively

Table 2. Mutations found in this study

Gene	Group of samples	AA change	Consequence	Gene position	Number of mutated samples ^{b)}	MAF ^{c)} in the subgroup population	dbSNP ^{d)} (rs)	Reference
KCNH2	GHP ^{a)}	P347S	Missense	Exon 5	1 ht	0.0012		[20]
KCNH2	GHP	R328C	Missense	Exon 5	1 ht	0.0012		[10, 21]
KCNH2	All	K897T	Missense	Exon 11	149 ht, 29 hm	0.2062	1805123	[22, 23]
	BrS				4 ht	0.0690		
	SIDS				2 ht	0.0588		
SCN5A	LQTS	IVS2as-24C>T	Splicing	Intron 2	1 ht	0.0114	41258344	[24]
SCN5A	BrS	R1512W	Missense	Exon 25	1 ht	0.0172		[24, 25]
SCN5A	SIDS	S1103Y	Missense	Exon 17	1 ht	0.0294	7626962	[26, 27]
SCN5A	LQTS	IVS24ds28C>T	Splicing	Intron 24	1 ht	0.0114	41312395	[24]
SCN5A	All	H558R	Missense	Exon 12	29 ht, 4 hm	0.0368	1805124	[23, 28, 29]

a) General healthy population.
b) ht, heterozygote and hm, homozygote.
c) Minor allele frequency.
d) dbSNP build 130 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp>).

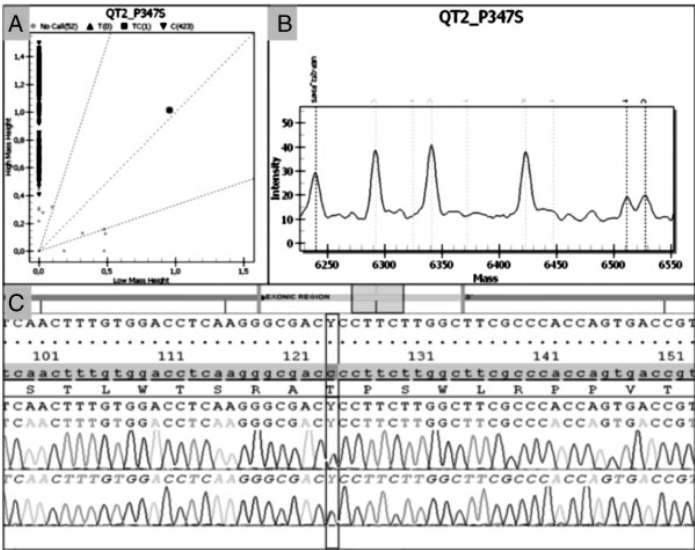


Figure 4. Detection of the genetic variant P347S at KCNH2. (A) MassARRAY cluster plot. Plot of low mass allele versus high mass allele for chosen assay and data type over all unique samples. (B) MassARRAY spectrum. Analyte signals, genotypes, and mass range are shown in color for the chosen genetic variant. (C) Sequencing results. Detection of the P347S genetic variant by sequencing. Forward and reverse sequences are shown.

frequent variants, three of them were polymorphic rare variants present only in one of the analyzed samples, and the remaining two were previously described in the literature as causal mutations for LQTS. The eight genetic variants detected were subsequently verified by direct sequencing, confirming the accuracy of the platform. In addition, KCNQ1 and KCNH2 exon sequencing was performed in the 39 index cases diagnosed with LQTS without specifying the subtype, checking the absence of all genetic variants included in the MassARRAY platform.

LQT1 and LQT2 genetic variants were studied in 451 samples and none of the LQT1 ones were found to be mutated, while in the case of LQT2 study, we found two samples with two different genetic variants. One of the genetic variants was described as a rare polymorphism in the healthy population [20], the P347S which is not included in the dbSNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>) and whose analysis is given in Fig. 4; and the other one was described as a causal mutation for LQTS, the R328C [10, 21]. We have also detected the polymorphic

variant K897T present in 35.6% of the samples as heterozygote and in 6.9% of samples as homozygote.

LQT3 assays were run in 90 samples and they showed the presence of 4 polymorphic variants and 1 mutation. Two of the polymorphic variants showed significant frequencies among the analyzed samples, IVS2as-24C>T (rs41258344) was present as heterozygote in seven samples and H558R appeared as heterozygote in 32.2% of samples and in 4.4% as mutated homozygote. The remaining polymorphic variant, IVS24ds28C>T (rs41312395), only appeared in one sudden death sample and it seemed to be a rare variant according to the dbSNP database.

4 Discussion

Sequenom MassARRAY[®] system based on semiautomated MALDI-TOF-MS allows us to give a rapid and efficient screening of the mutations described for the three main genes associated in bibliography with LQTS and BrS. We can detect heterozygous or homozygous mutations and SNP associated with a worst prognosis of the disease by using this technology with gain in time, labor, and cost efficiency compared with the conventional methods.

The DNA quality and amount is many times a limiting factor for genetic analysis, especially in sudden death-related diseases, where the genetic screening has to be performed postmortem, as it could be the case in many affected individuals of LQTS or BrS. In this study, in order to probe the effectiveness of the genotyping strategy of BrS samples with different qualities, three diverse groups of samples were included, general healthy population recruited at the medical center and sent to the laboratory for immediate DNA extraction, LQTS and BrS patients collected along the Spanish geography and therefore a longer wait before the DNA extraction, SCD samples collected at the time of autopsy and finally paraffin-embedded sudden infant death samples, which most of the time have been subjected to degradation by passing a preliminary alcohol fixation. Call rates obtained show a clear correlation with the quality of the sample (Supporting Information Table 5), nevertheless our results demonstrate that the selected genotyping strategy is optimum for extreme samples, where quality and quantity of DNA is a limiting factor. From our point of view, the fact that DNA samples with a high level of degradation have reliable results from the MassARRAY platform is because all tests are done in amplicons of about 100 bp, thus decreasing the likelihood to find such small fragments with broken DNA. Thus, conventional sequencing strategies for the SIDS paraffin samples failed in most of the cases, except sequences performed in very short amplicons of around 100 bp.

Mutations detected on MassARRAY technology were confirmed by direct sequencing and no inconsistencies were found between the sequencing results and our strategy, so we can assert that the sensitivity of the technology for mutation detection is adequate. Moreover, not only positive mutations were confirmed, in 39 of the analyzed samples

negative mutations were also confirmed, that is, the nonpresence of genetic variants considered in the KCNQ1 and KCNH2 genes. As expected given the frequency of mutations described in previous work on the genes studied [10], direct sequencing of these two genes in 39 cases of LQTS has enabled us to find genetic variants not yet included in the diagnostic approach presented here but that will be added in subsequent updates.

The design of multiplex reactions in Sequenom MassARRAY[®] is flexible so new mutations can be added as they are being described in bibliography, allowing to have a really open platform for mutation detection in comparison with other mutation technologies based on microarrays which often do not allow the incorporation of new mutations without affecting the previous designs.

In terms of speed, the strategy proposed represents a significant time saving over conventional methods. A 384 position SpectroCHIP[®] is typically processed in 45–60 min and the results are automatically loaded into a database that allows convenient data analysis. The total number of mutations considered (433 mutations) here can be analyzed in 48 h, while conventional methods are much more time consuming. Study of the 433 mutations by direct sequencing would entail to analyze 51 exons and therefore it would entail to perform a close number of sequencing reactions with the time and costs needed to carry out.

Forensic pathologists cannot find the cause of the death in these potentially lethal channelopathies because they do not leave evidence that can be found during a medico-legal autopsy. Molecular autopsy might be used in such cases to find the cause of the death, adding the genetic analysis to the autopsy protocol [30].

In case of finding the disease causal mutation, patients and relatives can receive rapid genetic counseling according to the relative risk of the mutation found in each case, allowing to implement when necessary a therapeutic treatment (for example, pharmacological treatment with β -blockers or Implantable cardioverter defibrillator-implantation).

To date, most genetic studies of LQTS continue to describe a high proportion of new mutations, which usually occur in single families, suggesting that saturation of potential LQTS-associated variants has not yet been achieved [3, 31]. Nevertheless, the more the mutations are being described in the literature and in our own studies and the more the mutations are being incorporated into our strategy, the greater the accuracy of diagnostic strategy and the number of patients who get genetically diagnosed in reduced time.

This rapid mutation screening will allow us to predict in the future the real risk of each individual according to the positive mutation they are carriers of. Functional studies are being developed, and informatic simulations can predict the risk of the different mutations according to the damage originated at the protein.

We have shown that the Sequenom MassARRAY[®] system is a reliable, convenient, highly flexible, and cost-efficient alternative to conventional methods for genetic

diagnosis of cardiac arrhythmic diseases such as LQTS and BrS. Nowadays, more than 800 mutations have been described in KCNQ1, KCNH2 and SCN5A, which may be embodied in our strategy, enabling an upgrade of the version presented here, since flexibility of the system allows us to update the assays whenever necessary.

This work was supported by grants from the health research fund of the Institute of Health Carlos III (PI060165) and Xunta de Galicia (PGIDIT06BTF). M. B. has a research contract financed by the Institute of Health Carlos III and the Galician Health service (EMER07/018). The authors appreciate the genotyping services provided by the Spanish National Genotyping Center (<http://www.cegen.org>), founded by Genoma España.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Virmani, R., Burke, A. P., Farb, A., *Cardiovasc. Pathol.* 2001, 10, 275–282.
- [2] Tester, D. J., Ackerman, J., *Curr. Opin. Cardiol.* 2006 21, 166–172.
- [3] Tester, D. J., Ackerman, M. J., *Annu. Rev. Med.* 2009, 60, 69–84.
- [4] Perrin, M. J., Subbiah, R. N., Vandenberg, J. I., Hill, A. P., *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2008, 98, 137–148.
- [5] Marban, E., *Nature* 2002, 415, 213–218.
- [6] Keating, M. T., Sanguinetti, M. C., *Cell* 2001, 104, 569–580.
- [7] Zareba, W., Cygankiewicz, I., *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2008, 51, 264–278.
- [8] Ackerman, M. J., Clapham, D. E., *N. Engl. J. Med.* 1997, 336, 1575–1586.
- [9] Keating, M., Dunn, C., Atkinson, A., Timothy, K., Vincent, G. M., Leppert, M., *Science* 1991, 252, 704–706.
- [10] Tester, D. J., Will, M. L., Haglund, C. M., Ackerman, M. J., *Heart Rhythm* 2005, 2, 507–517.
- [11] Chen, P. S., Priori, S. G., *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008, 51, 1176–1180.
- [12] Gussak, I., Brugada, P., Brugada, J., Wright, R. S., Kopecky, S. L., Chaitman, B. R., Bjerregaard, P., *Cardiology* 2000, 94, 99–102.
- [13] Brugada, R., Hong, K., Dumaine, R., Cordeiro, J., Gaita, F., Borggrefe, M., Menendez, T. M., Brugada, J., Pollevick, G. D., Wolpert, C., Burashnikov, E., Matsuo, K., Wu, Y. S., Guerchicoff, A., Bianchi, F., Giustetto, C., Schimpf, R., Brugada, P., Antzelevitch, C., *Circulation* 2004, 109, 30–35.
- [14] Priori, S. G., Schwartz, P. J., Napolitano, C., Bloise, R., Ronchetti, E., Grillo, M., Vicentini, A., Spazzolini, C., Nastoli, J., Bottelli, G., Folli, R., Cappelletti, D. N., *N. Engl. J. Med.* 2003, 348, 1866–1874.
- [15] Krous, H. F., Beckwith, J. B., Byard, R. W., Rognum, T. O., Bajonowski, T., Corey, T., Cutz, E., Hanzlick, R., Keens, T. G., Mitchel, E. A., *Pediatrics* 2004, 114, 234–238.
- [16] Wilde, A. M., Antzelevitch, C., Borggrefe, M., Brugada, J., Brugada, R., Brugada, P., Corrado, D., Hauer, R. N., Kass, R. S., Nademanee, K., Priori, S. G., Towbin, J. A., *Circulation* 2002, 106, 2514–2519.
- [17] Newton-Cheh, C., Eijgelsheim, M., Rice, K. M., de Bakker, P. I., Yin, X., Estrada, K., Bis, J. C., Marciante, K., Rivadeneira, F., Noseworthy, P. A., Sotoodehnia, N., Smith, N. L., Rotter, J. I., Kors, J. A., Witteman, J. C., Hofman, A., Heckbert, S. R., O'Donnell, C. J., Uitterlinden, A. G., Psaty, B. M., Lumley, T., Larson, M. G., Stricker, B. H., *Nat. Genet.* 2009, 41, 399–406.
- [18] Pfeufer, A., Sanna, S., Arking, D. E., Müller, M., Gateva, V., Fuchsberger, C., Ehret, G. B., Orru, M., Pattaro, C., Kottgen, A., Perz, S., Usala, G., Barbalic, M., Li, M., Putz, B., Scuteri, A., Prineas, R. J., Sinner, M. F., Gieger, C., Najjar, S. S., Kao, W. H., Muhleisen, T. W., Dei, M., Happle, C., Mohlenkamp, S., Crisponi, L., Erbel, R., Jockel, K. H., Naitza, S., Steinbeck, G., Marroni, F., Hicks, A. A., Lakatta, E., Muller-Myhsok, B., Pramstaller, P. P., Wichmann, H. E., Schlessinger, D., Boerwinkle, E., Meitinger, T., Uda, M., Coresh, J., Kaab, S., Abecasis, G. R., Chakravarti, A., *Nat. Genet.* 2009, 41, 407–414.
- [19] Oeth, P., Beaulieu, M., Park, C., Kosman, D., del Mistro, G., Van den Boom, D., Jurinke, C., SEQUENOM application note 2005.
- [20] Ackerman, M. J., Tester, D. J., Jones, G. S., Will, M. L., Burrow, C. R., Curran, M. E., *Mayo Clin. Proc.* 2003, 78, 1479–1487.
- [21] Grunnet, M., Behr, E. R., Calloe, K., Hofman-Bang, J., Till, J., Christiansen, M., McKenna, W. J., Olesen, S. P., Schmitt, N., *Heart Rhythm* 2005, 2, 1238–1249.
- [22] Iwasa, H., Itoh, T., Nagai, R., Nakamura, Y., Tanaka, T., *J. Hum. Genet.* 2000, 45, 182–183.
- [23] Mank-Seymour, A. R., Richmond, J. L., Wood, L. S., Reynolds, J. M., Fan, Y. T., Warnes, G. R., Milos, P. M., Thompson, J. F., *Am. Heart J.* 2006, 152, 1116–1122.
- [24] Rook, M. B., Bezzina Alshinawi, C., Groenewegen, W. A., van Gelder, I. C., van Ginneken, A. C., Jongasma, H. J., Mannens, M. M., Wilde, A. A., *Cardiovasc. Res.* 1999, 44, 507–517.
- [25] Deschênes, I., Baroudi, G., Berthet, M., Barde, I., Chalvidan, T., Denjoy, I., Guicheney, P., Chahine, M., *Cardiovasc. Res.* 2000, 46, 55–65.
- [26] Splawski, I., Timothy, K. W., Tatemura, M., Clancy, C. E., Malhotra, A., Beggs, A. H., Cappuccini, F. P., Sagnella, G. A., Kass, R. S., Keating, M. T., *Science* 2002, 297, 1333–1336.
- [27] Chen, J. Z., Xie, X. D., Wang, X. X., Tao, M., Shang, Y. P., Guo, X. G., *Chin. Med. J.* 2004, 117, 652–656.
- [28] Aydin, A., Bähring, S., Dahm, S., Guenther, U. P., Uhlmann, R., Busjahn, A., Luft, F. C., *J. Mol. Med.* 2005, 83, 159–165.
- [29] Chen, L. Y., Ballew, J. D., Herron, K. J., Rodeheffer, R. J., Olson, T. M., *Clin. Pharmacol. Ther.* 2007, 81, 35–41.
- [30] Rodríguez-Calvo, M. S., Brion, M., Allegue, C., Concheiro, L., Carracedo, A., *Forensic Sci. Int.* 2008, 182, 1–12.
- [31] Tester, D. J., Will, M. L., Haglund, C. M., Ackerman, M. J., *Heart Rhythm* 2005, 2, 507–517.

Supporting information

Table 1: Number of samples analyzed for each test according to the diagnostic classification.

Diagnostic Category	Number of samples	KCNQ1 test	KCNH2 test	SCN5A test
A	412	√	√	
B	39	√	√	√
C	5			√
D	17			√
E	29			√
Total	502	451	451	90

Table 2: Assay design for our study on Sequenom MassARRAY™ system

Gene	Number of mutations	Number of amplicons	Number of plexes
KCNQ1	151	126	14
KCNH2	149	128	15
SCN5A	133	128	9
Total	433	382	38

Table 4: Mass differences (Da) between the iPLEX products

Terminator	A	C	G	T
A	0	-24	16	55.9
C	24	0	40	79.9
G	-16	-40	0	39.9
T	-55.9	-79.9	-39.9	0

Table 5. Average call rates

	Whole sample	General healthy population	LQTS and BrS patients	SIDS cases
KCNQ1 test	93.01	93.26	90.33	
KCNH2 test	83.35	84.40	72.14	
SCN5A test	72.89		74.35	65.58

Gene	Mutation	Plex	1st-PCR Primer	2nd-PCR Primer	Amplicon Length (bp)	Concentration PCR primers (nM)	Extension Primer	Concentration Extension Primers (nM)
KCNQ1	G306R	W1	ACGTTGGATGTCGCCATGCTGGGAAGTTG	ACGTTGGATGTCGGCAGCTACGCCAGAT	86	100	TCCGAGTTACACGCC	0.73
KCNQ1	E160K	W1	ACGTTGGATGTATCGCTCCGGAAGAACAC	ACGTTGGATGAGGCTCTGAAGCCACTCAAG	117	100	CCACCAGCAGATCT	0.73
KCNQ1	I517T	W1	ACGTTGGATGACATCTCTCTCTCTCTCTG	ACGTTGGATCTTGGCCACAAGTACTGC	113	100	GCCACCATTAAGGTCA	0.73
KCNQ1	L342F	W1	ACGTTGGATGGCTCTCTGCTTACACACACGCCGC	ACGTTGGATGTCGAAGAGCAGCAAGCAAAAC	120	100	aTCCAGGGCGGGCTCT	1.08
KCNQ1	D202N	W1	ACGTTGGATGTTTGGCCGGAGCCCATTC	ACGTTGGATGCTCTGGCTTGGAAACATC	100	100	GATCTCTCTCTTGGCG	1.08
KCNQ1	D611Y	W1	ACGTTGGATGTCCTGCTGCTGGCTTTGTTC	ACGTTGGATGTCGAAGAGACAGCTGGTGA	109	100	gAGCCCATTCACATC	1.08
KCNQ1	R594Q	W1	ACGTTGGATGCTCTTTTGTCCCGACGACAG	ACGTTGGATGTCGCGACCATAGAGTTGAG	114	100	aTGGCGGACATCAACC	1.08
KCNQ1	E294K	W1	ACGTTGGATGTCGCTAGCTGCCGAAT	ACGTTGGATGCTCTCTGCTGACTTTGTTG	102	100	GCTACCTTGTCTTCTACT	1.43
KCNQ1	S566F	W1	ACGTTGGATGAGACGAGATGAACATGAG	ACGTTGGATGTGAACACTGGTGTCTGTGTC	95	100	ggatTGAAGGGCTTCCCAATG	1.43
KCNQ1	G345R	W1	ACGTTGGATGGAGCCTCTGTCCATCTCT	ACGTTGGATGTGAAGTCTTCTGCTCTCTG	107	100	cccaTGTCCATTCCTCCAG	1.43
KCNQ1	447delC	W1	ACGTTGGATGAGAGAAGATGTCACAGTCC	ACGTTGGATGTCACGAAGCTGTCAAGCC	116	100	cccaATATACAGTGGACCCCG	1.77
KCNQ1	Y315C	W1	ACGTTGGATGTGAGGTTCAAGTACCAC	ACGTTGGATGTGGGGTCAAGTACAGAGG	109	100	ltaaaGTCCACCATCTGGCT	1.77
KCNQ1	R25N	W1	ACGTTGGATGCACCACTCTCTTGGCAG	ACGTTGGATGTGGGTCAGGTGTAGAT	87	100	gggggCATCCGCTCTCTGGAGA	1.77
KCNQ1	131delCT	W1	ACGTTGGATGTGGCTCGCTCATCTTCAGC	ACGTTGGATGTACATCCAGCAAGAGATCC	100	100	ggcCATTCGAGCAGTATGCCGGC	1.77
KCNQ1	W379S	W1	ACGTTGGATGTGCTATGCTGCCGGAACC	ACGTTGGATGTAGATCTTCCAGGTGGAG	105	100	ciccGGAACCCGACTCTCTCCA	1.77
KCNQ1	631-437del20N	W2	ACGTTGGATGTCGACGAGCCGCACTGTC	ACGTTGGATGTGCTCTCTTGCACGGTGG	113	100	GACCTCAGACCCGAT	0.73
KCNQ1	T144A	W2	ACGTTGGATGTACCATCCAGAAAGAGTCC	ACGTTGGATGTGGTCTGCCCTCATCTTCAGC	120	100	CAGGGCTGGGTGATG	0.73
KCNQ1	P343S	W2	ACGTTGGATGGCTTCTGTCTTTGCCATC	ACGTTGGATGTCCAAAGGACCAAGGAAAC	100	100	GCATACTGCTCGATGG	0.73
KCNQ1	S277L	W2	ACGTTGGATGGATAACCACTGTATACATC	ACGTTGGATGTCTCTCCAGCAGGTACAC	92	100	TCTCTCTTTTGGCGTC	1.08
KCNQ1	V524G	W2	ACGTTGGATGGCCACCACTAAGTCAATC	ACGTTGGATGCAGGGCTTACCTGGAAATTC	88	100	GGCCTCATCTTCTCT	1.08
KCNQ1	G568A	W2	ACGTTGGATGAGACGAGATGAACATGAG	ACGTTGGATGTGAACACTGGTGTCTGTCTG	95	100	ACGCATGCAGTACTTTG	1.08
KCNQ1	Q356Sfp	W2	ACGTTGGATGTGAAGTGTCTTGCCTCTG	ACGTTGGATGTCTGTCCATCTTCCACGC	102	100	cccgcCTCTGCTCTGCT	1.08
KCNQ1	L114P	W2	ACGTTGGATGTCCATCTACACACGCGCG	ACGTTGGATGAACGAGCATTTCCAGCCG	120	100	GGCCGCTGTCTACAACTCC	1.43
KCNQ1	V307L	W2	ACGTTGGATGTCCCATGCTCGTGAAGTTTC	ACGTTGGATGTCCGACGCTAGCCAGAT	86	100	ggjAGTTCCGAGTACCA	1.43
KCNQ1	R584G	W2	ACGTTGGATGGCATGACTACCGATATG	ACGTTGGATGAGCATAGCTGGGCTCTG	93	100	CGATGATGGMATGGGCTTC	1.43
KCNQ1	R259L	W2	ACGTTGGATGTCCGCTCTGTCCCAACCT	ACGTTGGATGTGGGCTCCGCTGGTCTTCA	100	100	cccaGCGGCCACCACCTGG	1.43
KCNQ1	T587M	W2	ACGTTGGATGGGGTGTTTTATCCCATAG	ACGTTGGATGTCTTACTAGGTCTCAGG	100	100	ccaggATCGCGGACGACAACA	1.77
KCNQ1	R539W	W2	ACGTTGGATGCTGGAGTACTGCTCAATG	ACGTTGGATGGGTGTCTTTTGTCCG	96	100	cggaCTGCTCAATGAGGTCCC	1.77
KCNQ1	R562M	W2	ACGTTGGATGGTGCATGACAGCTGGG	ACGTTGGATGTGGTGCATCGACAGAGCTG	120	100	gggaCTTTGGCCGTGCCCCAC	1.77
KCNQ1	S373P	W2	ACGTTGGATGAAGATGACAGTACAGGGC	ACGTTGGATGAAGGACAGCACTCAAC	109	100	aggaCCCGACCTGAAATGAGTG	1.77
KCNQ1	G188R_G_A	W2	ACGTTGGATGAGAGGCCACGTACTTGTCTG	ACGTTGGATGTCTTCCCTCGACCTGGAGAT	120	100	gggTGGACACGCTACTCCGTCC	1.77
KCNQ1	A226V	W2	ACGTTGGATCTTGTGGCACAGCCAC	ACGTTGGATGTAGCTCATCGTACCCTG	119	100	ggggTGCACAGACGACCTGATG	1.77
KCNQ1	D317N	W2	ACGTTGGATGAAGACAGAAAGCAGGAGG	ACGTTGGATGTAGCTCATCGTACCCTG	106	100	cggaCCACCTGTGGGGCACCTTTGT	1.77
KCNQ1	G345E	W3	ACGTTGGATGTGAAGTGTCTTGCCTCTG	ACGTTGGATGGAGCCTCTGTCTCATTTCTT	107	100	CCCGAGCAAGAATC	0.73
KCNQ1	R451Q	W3	ACGTTGGATGAGAGAAGATGTCACATGCTC	ACGTTGGATGTCACGAAGCTGTCAATGCC	116	100	IACCCCGACAAGAGC	0.73
KCNQ1	G292D	W3	ACGTTGGATGTACCTGGCTAGCAAGAGAC	ACGTTGGATGTGGCAGCTTACCAACCC	118	100	aCGGTGAACGAGTCTAG	0.73
KCNQ1	B591H	W3	ACGTTGGATGGAGCCTACCTTCTCTCTAC	ACGTTGGATGCCCATAGAAAGAGCAAG	99	100	CTTCTACTGGGTCTAGG	1.08
KCNQ1	IVS13as-G_A	W3	ACGTTGGATGACGAGAGATGAACATGAG	ACGTTGGATGTGAAGCTGGTGTCTGTGTC	95	100	aaATGGAATGCTCCAGC	1.08
KCNQ1	336delC	W3	ACGTTGGATGTCAAGAGCGCAGGAAAC	ACGTTGGATGTGCTCTCTCTCTCTCTCTG	110	100	GCcAAAGAAAGAGATG	1.08
KCNQ1	R555C	W3	ACGTTGGATGAGCTTCTGAGCAGTACTCG	ACGTTGGATGTACCTCTCTCTCTCTCTCTG	90	100	aaactCAACCTCATGGTG	1.08
KCNQ1	R5185fp	W3	ACGTTGGATGACATCTCTCTCTCTCTCTCT	ACGTTGGATGTCTTGGCGACAAGTACTGTC	113	100	GGCCACCATTAAGGTCAIT	1.08
KCNQ1	V133	W3	ACGTTGGATGCATCTCTCTCTCTCTCTCTCT	ACGTTGGATGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	95	100	gAGATGAGGCACGACAGGA	1.43
KCNQ1	F193L	W3	ACGTTGGATGCTCACCGATGATGAAATGG	ACGTTGGATGGCAAGTACGTGGGCTCTG	86	100	ggagATGGGCTTCCGGGCA	1.43

Estudio genético de la muerte súbita cardíaca: Miocardiopatía Hipertrófica Familiar y Síndrome de QT Largo.

Gene	Mutation	Plex	1st-PCR Primer	2nd-PCR Primer	Amplicon Length (bp)	Concentration PCR primers (nM)	Extension Primer	Concentration Extension Primers (nM)
KCNQ1	A371T	W3	ACGTTGGATGAGAGGACGAGACCTTCAAG	ACGTTGGATGAGAAATGACAGTACAGCAGGGG	109	100	tcacacccggcacatcccgggg	1.43
KCNQ1	P171L	W3	ACGTTGGATGCGCGCTCTACAAGTCTCTC	ACGTTGGATGACTACTCACACGGGCGAAGTGG	91	100	cccacaaacttcctctcgaaggtc	1.43
KCNQ1	W392R	W3	ACGTTGGATGTGGGTGACAGAGAGTGTG	ACGTTGGATGTGCTATGCTGCCGAGAACCC	105	100	gaacttcgggatgtactatctctcc	1.77
KCNQ1	D242N	W3	ACGTTGGATGTGCTGACAGATCTGAGGATG	ACGTTGGATGAGTACACACGAGGCCAG	96	100	tgagatgagatgactatctacgttc	1.77
KCNQ1	188 delG	W3	ACGTTGGATGAGAGGCCACGACTACTTGCTG	ACGTTGGATGACTCTGTCTCCGTCGAGAGAT	120	100	gggtgagacacgactactctccgtcc	1.77
KCNQ1	T311I	W3	ACGTTGGATGTGACCACTGCTCCCTCTCCCT	ACGTTGGATGTGAGTACAGTACAGCACCATC	118	100	ggatctccctgacagctgtacagtgca	1.77
KCNQ1	T322A	W4	ACGTTGGATGAAGACAGAGAGAGAGG	ACGTTGGATGAGTGTGAGTGTGAGTGTGCT	106	100	ttctcccgacccacag	0.73
KCNQ1	167-168delIN	W4	ACGTTGGATGACTGTGCTGACAGGAGAT	ACGTTGGATGATTAACACCTGTACATCTGCT	120	100	tgctgggtgggttct	1.08
KCNQ1	Y281C	W4	ACGTTGGATGTGTTACCGGCTGCTCTCTC	ACGTTGGATGATTAACACCTGTACATCTGCT	103	100	ttctctctcagccag	1.43
KCNQ1	R555H	W4	ACGTTGGATGTGTTACCGGCTGCTCTCTC	ACGTTGGATGATTAACACCTGTACATCTGCT	99	100	ctgacagctcttgatg	1.77
KCNQ1	L250H	W4	ACGTTGGATGTGGATGAAGACACAGGAG	ACGTTGGATGTGCTTCTAGGTGCTCTCAG	94	100	agaccacggagcccagg	1.43
KCNQ1	R583C	W4	ACGTTGGATGGGGTGTATTATCCCCATAG	ACGTTGGATGTGCTTCTAGGTGCTCTCAG	100	100	ccatagaagaagcaaggat	1.77
KCNQ1	P448R	W5	ACGTTGGATGTACCAAGCTGTACTAGCC	ACGTTGGATGAGAGAGATGCTACAGTCTG	116	100	agccgcgcgtcttct	0.73
KCNQ1	Y171Sdp	W5	ACGTTGGATGTGCTGGTGGTGTCTCTTC	ACGTTGGATGAGAGGCCACAGTACTGCTG	101	100	cttcggagcggaagta	1.08
KCNQ1	A344EV	W5	ACGTTGGATGGCTCTGTGTTGGCATC	ACGTTGGATGCCAAGGACGAGGGAAC	100	100	ttcttttggctccag	1.43
KCNQ1	R190Q	W5	ACGTTGGATGCTACCAAGTATGGAATGG	ACGTTGGATGCAAGTACGTGGGCCCTCT	86	100	tcggggcacaagggcagc	1.77
KCNQ1	P320A	W5	ACGTTGGATGAGTACAGTACACACATC	ACGTTGGATGAAGACAGAGACGAGG	106	100	ttctatgggacaggtg	1.77
KCNQ1	F275S	W5	ACGTTGGATGTCTAGCCAGGTACACAAG	ACGTTGGATGTGTGTTTCTGGCCTTAGGAG	110	100	ggacacaaagtacagaggag	1.77
KCNQ1	G189R	W6	ACGTTGGATGTACCTGGGCTGGAAGAC	ACGTTGGATGTGAGTTCGAGCTTACCAACC	114	100	caaagcgacgcggc	0.73
KCNQ1	R293C	W6	ACGTTGGATGGCTTCTGTCTTGCCATC	ACGTTGGATGCCAAGGACCGAGGAAAC	118	100	gtgaacaggtcaggc	1.08
KCNQ1	A341EV	W6	ACGTTGGATGATCCTGAGATGCTACAC	ACGTTGGATGTGGATGAAGACACGAGG	100	100	tgccatctctcttctttg	1.43
KCNQ1	W248R	W6	ACGTTGGATGATCCTGAGATGCTACAC	ACGTTGGATGAAGACAGAGAACGAGG	94	100	acgccagggagggcacc	1.77
KCNQ1	G316R	W6	ACGTTGGATGAGTCAAGTACCACATC	ACGTTGGATGTGATACAGGAGAGTGAAG	106	100	gggaccacctcgcgctat	1.77
KCNQ1	G289S	W6	ACGTTGGATGCACACTGTGTTTCTTG	ACGTTGGATGTGATACAGGAGAGTGAAG	100	100	tgagaccacctgtacatc	1.77
KCNQ1	W305SpS	W7	ACGTTGGATGCTGGAAGTTCGGACTTACC	ACGTTGGATGTGAGAAGGACGCGGTGAAC	112	100	cgacttaccacccc	0.73
KCNQ1	L251P	W7	ACGTTGGATGACCTGGCGTGGATGAAGAC	ACGTTGGATGAGATCCTGAGATGCTACAC	102	100	agaccacggagccc	1.08
KCNQ1	V172M	W7	ACGTTGGATGCTGCTGGTGGTGTCTTTC	ACGTTGGATGTCCGTCGAGTCAAGTAC	101	100	ttcggagcggagctac	1.43
KCNQ1	G314SC	W7	ACGTTGGATGAAGACAGAGACGAGG	ACGTTGGATGCTCGAGGTCAAGTAC	113	100	gccttgcctccatagc	1.77
KCNQ1	G272D	W7	ACGTTGGATGTGTTTCTGGCCTAGGAG	ACGTTGGATGGGTACACAAGTACGAGGAG	101	100	tgcatcggccttctcgg	1.77
KCNQ1	S140G	W7	ACGTTGGATGATCTGCTGATGTGGAC	ACGTTGGATGTGTGACAGCTCTCTATC	89	100	gatgtggagacagcagg	1.77
KCNQ1	L353P	W8	ACGTTGGATGTGAAGTGTCTTGCCCTG	ACGTTGGATGCTGTCCATCTCTCCAC	102	100	ttctgctgcaccttc	0.73
KCNQ1	A300T	W8	ACGTTGGATGTACCTGGCTGAGAAGGAC	ACGTTGGATGAAGTTCGCGATCTACACCC	118	100	gagttcgggagagctac	1.08
KCNQ1	R231C	W8	ACGTTGGATGTGAGTGTAGTACTCTCAG	ACGTTGGATGACACATCTCTCTGACG	81	100	ggaatcgcaggaagc	1.43
KCNQ1	189nsG	W8	ACGTTGGATGTGATGGAATGGGCTTCCG	ACGTTGGATGAGGTCTGAAAGCCACTGAG	115	100	agcgcagccgcccc	1.77
KCNQ1	183delT	W8	ACGTTGGATGTACTCTGCTCCGGAAGAC	ACGTTGGATGAGGTCTGATGTGTTTCTGG	118	100	gcggaaagacacacac	1.43
KCNQ1	L266P	W8	ACGTTGGATGTACGAGGAGAGATGAGG	ACGTTGGATGCACACTGTGTGTTTCTGG	100	100	acaggaagccgagctgac	1.77
KCNQ1	T309RI	W9	ACGTTGGATGATCCGTGGCTGACCACTGT	ACGTTGGATGATGTTCCTCCATGAGGTCA	88	100	caatctccctgcagggtca	1.77
KCNQ1	A178TP	W9	ACGTTGGATGTGCTGGTGGTGTGTTCTC	ACGTTGGATGAGGCCACAGTACTGCTG	101	100	gtcgcctctggtcc	0.73
KCNQ1	D317G	W9	ACGTTGGATGAGTCAAGTACACACCATC	ACGTTGGATGAAGACAGAGAACGAGG	106	100	ccatcgctatgagg	1.08
KCNQ1	G306V	W9	ACGTTGGATGTGGCGTACGCTACGCAGAT	ACGTTGGATGCCCATGCGCTGGAGTTTC	86	100	atggcgtgtgtggg	1.43
KCNQ1	R243H	W9	ACGTTGGATGGTGGATGAAGACACGAGG	ACGTTGGATGAATCTGAGATGCTACAC	94	100	cgaggtgcctctcctgg	1.77
KCNQ1	385nsIN	W9	ACGTTGGATGTGAAATGATGAGGCTGCCG	ACGTTGGATGATCTTGCTCTGGGGTTTG	119	100	ggtagaagctctctg	1.77
KCNQ1	339-340delIN	W9	ACGTTGGATGTGCTCTCTCTGCTCTTTC	ACGTTGGATGTCCAAAGGACGAGGAAAC	104	100	tgcttttggcactctctt	1.77
KCNQ1	G289D	W9	ACGTTGGATGGACACTGTGTGTTTCTTG	ACGTTGGATGTGACGAGGAGATGATGAG	100	100	gggcccctcttactatcg	1.77
KCNQ1	I313M	W10	ACGTTGGATGAAGACAGAGAACGAGGAG	ACGTTGGATGCTCCGACGGTCAAGTAC	113	100	ctttgcccatagcc	0.73
KCNQ1	A194P	W10	ACGTTGGATGACCAAGTACGTGGGCCCTCTG	ACGTTGGATGCTCACCGATGATGAATGG	86	100	ggcgcgctgctgcttt	1.08

Gene	Mutation	Plex	1st-PCR Primer	2nd-PCR Primer	Amplicon Length (bp)	Concentration PCR primers (nM)	Extension Primer	Concentration Extension Primers (nM)
KCNQ1	A590T	W10	ACGTTGGATGGAGCGTACCTGTGCTTCTAC	ACGTTGGATGGCGCCGATAGAAAAGAGCAAG	99	100	ACGTGGTTTCAGGCGGG	1.43
KCNQ1	R3680P	W10	ACGTTGGATGTGAAGGTGACAGCAAGAGAG	ACGTTGGATGACCCGACCTGAATGAGTGAAG	98	100	GCAGAGCACTTCAACC	1.77
KCNQ1	S548L	W10	ACGTTGGATGATGAGCGACCATGAGGTTGAG	ACGTTGGATGCTTTTGTTCCTCCGACGACAG	113	100	ggTTGAGGTGGCCCTGCG	1.77
KCNQ1	L273F	W10	ACGTTGGATGGGTACAAAGTACGAGAGG	ACGTTGGATGTGTGTTTCTGGCCCTAGGAG	101	100	AGTACGAGGAGGAATGA	1.77
KCNQ1	G314DA	W11	ACGTTGGATGTCCCTGCAGTACAGATGCAC	ACGTTGGATGTGGCAGACAGACAGAGACAG	117	100	CAGTACCACCATCG	0.73
INS746-1G_A_C_T	V248M	W11	ACGTTGGATGTCAAGAGAGCCAGGAGAAAC	ACGTTGGATGTGGCAGACAGAGAGAGAG	106	100	CCGACGGGACCTAC	1.08
	307delN	W11	ACGTTGGATGACCCACCTGGCGGTGGATG	ACGTTGGATGAGTCTGAGGATCTGAGATCTAC	86	100	CGGTGGATGAGACCA	1.08
	E281K	W11	ACGTTGGATGCCGACCATCTGCTGTGTTCTG	ACGTTGGATGTGGCAGCTACGCGATCGACAG	101	100	GGAAATTTCCGACCTAAC	1.43
	R174H	W11	ACGTTGGATGAGAGCCACCTGCTGTGTTCTG	ACGTTGGATGTGGTGTGGTGTGTTCTTC	101	100	atGTGTTTTCGGCCTAG	1.43
KCNQ1	S349W	W11	ACGTTGGATGTCTCTCACTTCCTCCACG	ACGTTGGATGTGAAGTCTCTCTCCCTCTG	102	100	gaaAGGGGATCTTGCGT	1.77
KCNQ1	G589D	W11	ACGTTGGATGTCTCTCACTTCCTCCACG	ACGTTGGATGTGAAGTCTCTCTCCCTCTG	100	100	ggggCGGTTTCAGCGGGCG	1.77
KCNQ1	R533W	W11	ACGTTGGATGGAGTACTGCTCAATGAC	ACGTTGGATGGAGTCTCTCTCTCTCTCTG	94	100	cgaaCATCTGAAGCTTCC	1.77
KCNQ1	Q395P	W12	ACGTTGGATGAGAGAGGCTAGCACAGGG	ACGTTGGATGGCCACCTAAGGTCACTACG	101	100	gggaAGCACAGGCTTACCT	1.77
KCNQ1	G179S	W12	ACGTTGGATGTCTGCTGTGTTGTTCTTC	ACGTTGGATGAGAGGCGCACGTAAGTCTG	101	100	CGCTGTGTGCGCC	0.73
KCNQ1	191-193delN	W12	ACGTTGGATGCTACCCGATGTGAAATGG	ACGTTGGATGACAACTAGCTGTGGCCTCTG	86	100	GCTCCGGGGAAGG	0.73
KCNQ1	Y278H	W12	ACGTTGGATGTACCCGGTCTCTCTGAC	ACGTTGGATGTAACCCCTGCTACATCGG	106	100	GCAGGTACACAAGT	1.08
KCNQ1	K318N	W12	ACGTTGGATGAGTCAAGTACAGCTACGACATC	ACGTTGGATGTAAGACAGAGAGAGAGAGAG	106	100	ggCGGTATGGGACAA	1.08
KCNQ1	K57E	W12	ACGTTGGATGTCTGCTCACTCTCTCCAG	ACGTTGGATGTGGCGGTGGCCACCTCTC	99	100	ctCTATGTTGGGCATC	1.43
KCNQ1	Q357R	W12	ACGTTGGATGTCTGCTCACTCTCTCCAG	ACGTTGGATGGGTGTAAGTGTCTCTGCTCT	104	100	ttCCCTGAAGGTGACG	1.43
KCNQ1	A525V	W12	ACGTTGGATGACAGGGCTTACCTGGAAATTC	ACGTTGGATGACAGCTTCTGGGTTTGGG	88	100	TTACCTGGAAATTTCTCTTG	1.77
KCNQ1	396delC	W12	ACGTTGGATGACCTCCACCTGGAGAT	ACGTTGGATGAGTGGCAGCTACGACAGT	106	100	gaACCTGGAAATCTACATC	1.77
KCNQ1	INS648G_T	W13	ACGTTGGATGCCCATGCTGGAGATTTC	ACGTTGGATGAGAGGCCACCTGCTGCTTC	86	100	TGGAAGTTTCGGACTTA	0.73
KCNQ1	R174C	W13	ACGTTGGATGTCTGCTGTGTTGTTCTTC	ACGTTGGATGAGAGGCCACCTGCTGCTTC	101	100	GGACGGATACGTGGTCT	0.73
KCNQ1	INS2465G_A	W13	ACGTTGGATGAGAGGCCACCTGACATCCAG	ACGTTGGATGTCTGCTGCTGCTGCTGCTG	116	100	GCCATGCCCTCAGAGCTCA	1.08
KCNQ1	I567S	W13	ACGTTGGATGAGAGGCCACCTGACATCCAG	ACGTTGGATGTCTGCTGCTGCTGCTGCTG	95	100	TGAACGTGAGGGTCTCCA	1.08
KCNQ1	E261D	W13	ACGTTGGATGAGAGGCCACCTGACATCCAG	ACGTTGGATGTCTGCTGCTGCTGCTGCTG	100	100	GATGTACAGGTTGGTATCAG	1.43
KCNQ1	A525T	W13	ACGTTGGATGAGAGGCCACCTGACATCCAG	ACGTTGGATGTCTGCTGCTGCTGCTGCTG	88	100	CTTACCTGGAATTTCTTGG	1.43
KCNQ1	INS848-1G_C	W13	ACGTTGGATGATACCCGATGCTGTGAC	ACGTTGGATGTGGTTTGGTTAGCAGCTTGG	118	100	ggaaaTGGTGTGACGTGTGAC	1.77
KCNQ1	R368W	W13	ACGTTGGATGTGAAGGTGACAGCAAGAGAG	ACGTTGGATGACCGACCTGAATGAGTGAAG	98	100	AGGAGAGGAGAGGACCTTCAAC	1.77
KCNQ1	A302V	W14	ACGTTGGATGAGATTTCCGACTTACCACCC	ACGTTGGATGTGACACCTGTGTGTTTCTGG	114	100	CCACCCCCACACAGC	0.73
KCNQ1	Y184S	W14	ACGTTGGATGAGTACGTGTGCTGCGCTCTG	ACGTTGGATGTATGGAATGAGGCTTCCG	118	100	CGGCTGCCGCGACAAGT	1.08
KCNQ1	V310I	W14	ACGTTGGATGATCGTGGCTGACCACTGT	ACGTTGGATGAGCTTCCCTCATGCCGAT	88	100	ctCTCCCTGACAGTCA	1.43
KCNQ1	F157C	W14	ACGTTGGATGTGTCACCATCGACAGTAT	ACGTTGGATGAGAGGCCATGACATCCGAT	116	100	CTTGGCCACGGGACCTCTCT	1.77
KCNH2	987delCT	W1	ACGTTGGATGGAGAGAGAGAGAGAGCTTGG	ACGTTGGATGTAGACAGCACACCGCTGCCA	112	100	GACATTTGCACACCC	0.73
KCNH2	D501N	W1	ACGTTGGATGCAAGATGACAGAGGTGAAG	ACGTTGGATGCTACTTCAAGGCTGTGCTTC	86	100	TGGCGCCACCATGT	0.73
KCNH2	508-1G_A	W1	ACGTTGGATGTGTACTCAGGCACAGCTGC	ACGTTGGATGTGCTGCTCCCTCACCCACA	99	100	GCCCAGGACAGGAC	0.73
KCNH2	K101E	W1	ACGTTGGATGTGTGCTGCTCCGCTCTCTTGA	ACGTTGGATGGCAAGTGGAAATCGGCTTTC	112	100	CCGCTCTCTACCATCTT	0.73
KCNH2	T474I	W1	ACGTTGGATGGACATCTCTACATCTCC	ACGTTGGATGACACGCTGTGAAGTGTG	119	100	CATCACTTCGACCA	0.73
KCNH2	P596L	W1	ACGTTGGATGACACCTGGCGACCAAGTAT	ACGTTGGATGCTGACATGCTGTCTCTG	101	100	CGACCAGTAGGCAAAAC	1.08
KCNH2	C448Sp	W1	ACGTTGGATGAAATTCATATCGCCAAAGC	ACGTTGGATGAGCGGACACAGCTGGCAGAA	100	100	agGCGCGCTCATCTACTG	1.08
KCNH2	K897T	W1	ACGTTGGATGAGCGACGATGCTCTCTCTC	ACGTTGGATGTCCGAGCTTCAACCTGTGT	114	100	ggCGAGGCGCCACGACAA	1.08
KCNH2	R784W	W1	ACGTTGGATGTGCTACCCGCTGTGCTACTTC	ACGTTGGATGTACCCAGGATGACCTGTGT	99	100	CGCCCTGTACTTCATCTCC	1.08
KCNH2	S621N	W1	ACGTTGGATGAGGACAGGATATGTGACGGC	ACGTTGGATGTCTGTGAGTGTGTTGGG	112	100	tcCTACTTACCTCTACGAA	1.08
KCNH2	Y447Sp	W1	ACGTTGGATGATGATGTCCACGATGAGGTC	ACGTTGGATGTGAAGAGAGAGGAAAGGAC	108	100	cgagACGCGCTGGCAGGC	1.43
KCNH2	R176W	W1	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATGATG	ACGTTGGATGTGAAGTGTGCGCCGCGCTGCTG	120	100	gaACCGACCGACGACTCC	1.43

Estudio genético de la mutación sùbita cardíaca: Miocardiopatía Hipertrófica Familiar y Síndrome de QT Largo.

Gene	Mutation	Plex	1st-PCR Primer	2nd-PCR Primer	Amplicon Length (bp)	Concentration PCR primers (nM)	Extension Primer	Concentration Extension Primers (nM)
KCNH2	Y675Tp	W1	ACGTTGGATGACGATCTGTGTGGTAGG	ACGTTGGATGATGCTAGCATCTTCGGCAAC	100	100	ccgttggcggcgtgtgcccga	1.43
KCNH2	E892Sp	W1	ACGTTGGATGTGAAGTACTCTCGAGCG	ACGTTGGATGTACCAACACAGATGCTGCG	109	100	algttggaaagccgaagact	1.43
KCNH2	R863Sp	W1	ACGTTGGATGAGCTGAGAGAGAGAGATG	ACGTTGGATGGATTTCTCGACACACTCTTG	120	100	ccgcagcagccgaactcaccatctc	1.43
KCNH2	W1001Sp	W1	ACGTTGGATGCTCTCGAGAGTGTCTCAAC	ACGTTGGATGATGAGGGGATGATTTGGG	95	100	gtccacacatttttcacgcttctg	1.77
KCNH2	R328C	W1	ACGTTGGATGGCTTGCCTACCTCAACCTTC	ACGTTGGATGAAGTGTGAGGTGATTTGGG	100	100	ctcctccgaccctgtgctgacctac	1.77
KCNH2	G572FC	W1	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	117	100	agtcctgcactctgtgctgacctac	1.77
KCNH2	A422T	W1	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	99	100	gctcagtaggggtgtggaagacag	1.77
KCNH2	R534C	W1	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	98	100	tcctcagctctccgcgcacgc	1.77
KCNH2	M124R	W1	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	101	100	gcctccgaaattaggagtagaac	1.77
KCNH2	M400N	W1	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	119	100	ccacggcgtaccacccgctggaccca	1.77
KCNH2	M645VL	W1	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	118	100	gggaacactccacagccaatgagca	1.77
KCNH2	193-194delN	W2	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	120	100	tcacgctgcacaccc	0.73
KCNH2	484ns17N	W2	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	120	100	cgcccgacagctscct	0.73
KCNH2	S631A	W2	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	119	100	gctctcgacacgctc	0.73
KCNH2	K39E	W2	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	104	100	ttggcgatgatgaact	0.73
KCNH2	799delC	W2	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	120	100	accacacccataccacag	0.73
KCNH2	P451L	W2	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	108	100	ggtccacacacccacagc	1.08
KCNH2	651delAT	W2	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	96	100	ggacagccccccgccccctc	1.08
KCNH2	N588D	W2	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	83	100	ctatctgtgtccgcaggt	1.08
KCNH2	10ds1G_A	W2	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	94	100	agcaggcgaccccaactca	1.08
KCNH2	F805SC	W2	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	85	100	cccccttccaggcctcccca	1.08
KCNH2	R366Sp	W2	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	89	100	agcacttaagataaagag	1.43
KCNH2	L413P	W2	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	92	100	ggatgacacagcagagatg	1.43
KCNH2	R312C	W2	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	92	100	ctttgcctatgcacccactg	1.43
KCNH2	H492Y	W2	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	108	100	aaCCGGCGCGATCGCCGTC	1.43
KCNH2	V612L	W2	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	105	100	atCCATCAAGGAAGTAT	1.43
KCNH2	Y99S	W2	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	118	100	gaAAGTGGAAATCGCTTCT	1.77
KCNH2	897delG	W2	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	98	100	ggaggagtcggcaagcgcaagc	1.77
KCNH2	557delT	W2	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	112	100	ggaggagtcggcaagcgcaagc	1.77
KCNH2	G83R	W2	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	100	100	ccaaactcggcccgagagtagc	1.77
KCNH2	R7451Q	W2	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	120	100	ctttcagcactggcaaacctctc	1.77
KCNH2	R531Q	W2	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	98	100	ggggcgccggcgagagtagc	1.77
KCNH2	R835W	W2	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	90	100	ggggcgccggcgagagtagc	1.77
KCNH2	251delC	W3	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	99	100	aggggagcctacacagatccat	1.77
KCNH2	N861I	W3	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	99	100	ctcactcttcgacgg	0.73
KCNH2	F640L	W3	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	84	100	catgacagcatgga	0.73
KCNH2	Y493Sp	W3	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	108	100	gAACCAAGCCCTTGAAG	0.73
KCNH2	S261	W3	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	120	100	gtCCCGCCCCCTTGAAG	1.08
KCNH2	296delG_inspAA	W3	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	87	100	atGGCGCGGGGGTGCT	1.08
KCNH2	V822M	W3	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	99	100	aaagtcgaacggggat	1.08
KCNH2	R592C	W3	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	97	100	CAGCCACACATGGACTCA	1.43
KCNH2	A614V	W3	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	110	100	AGAACAGTATGTGACGG	1.43
KCNH2	421delA	W3	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	102	100	CTGCTGCTGGTCACTAC	1.43
KCNH2	544delAG	W3	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	116	100	AACTGGATGCTACTACG	1.43
KCNH2	A561V	W3	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	103	100	agcactttggcgctcatcg	1.43
KCNH2	Q725Sp	W3	ACGTTGGATGCTTGCCTATGTGCACTTTG	ACGTTGGATGATCGCTGCTGCTGCTATG	98	100	ctccggcagatgtcagcct	1.77

Gene	Mutation	Plex	1st-PCR Primer	2nd-PCR Primer	Amplicon Length (bp)	Concentration PCR primers (nM)	Extension Primer	Concentration Extension Primers (nM)
KCNH2	G47V	W3	ACGTTGGATGAGGCTCGCTGCATCAGCTG	ACGTTGGATGAGAGTGCAGCGTGCATCTAC	101	100	ggatgcacagctgcgcagaag	1.77
KCNH2	I98T	W3	ACGTTGGATGAGATGGCGGACGCACTGCT	ACGTTGGATGCGCGCTCTACCATCTTTC	97	100	ggagagagccgcaagtggaag	1.77
KCNH2	P347S	W3	ACGTTGGATGTATGATCTCAGCTGCTACGTGG	ACGTTGGATGTTCCCAAAATCAACCTCTAC	97	100	agttggcgagagccgaagaggg	1.77
KCNH2	E989Sfp	W3	ACGTTGGATGGCGGACCTGAGCGGCTCTC	ACGTTGGATGGAGGAGGTGTCGGCTTGG	118	100	caatggccgccccggcgctactc	1.77
KCNH2	59s-2A_G	W3	ACGTTGGATGTGTGATGCGGCTGTGGTGTAG	ACGTTGGATGTGTCCACAGATGCCCAATCC	102	100	cagttgctgctggagtgactccct	1.77
KCNH2	5818L	W3	ACGTTGGATGTGTGATCAGGCGACAGCTC	ACGTTGGATGTGTCCACAGATGCCCAATCC	99	100	gltggggccgagagtgactccct	1.77
KCNH2	740nsT	W4	ACGTTGGATGGATCTTGTGTAGTGCACAG	ACGTTGGATGTCCTGACACCTGTATGCAAG	99	100	cgcacatccccgttc	0.73
KCNH2	Y493C	W4	ACGTTGGATGATCTGCCCTGCACCTGAAC	ACGTTGGATGCTTGAACCTCAATGCGCAGG	120	100	caactgtgcagcact	0.73
KCNH2	872delC	W4	ACGTTGGATGTGTGATGAGGAAACGACG	ACGTTGGATGCCACTACGACCTCTAACTC	108	100	gaaccagcccttgaag	0.73
KCNH2	R1014Sfp	W4	ACGTTGGATGGGCGCTGTACTGATTTTG	ACGTTGGATGTGAAGCCACCTCTAACTC	100	100	ctgattcccgggctcccc	0.73
KCNH2	1038insG	W4	ACGTTGGATGCAACATTTTACGCTCTGGG	ACGTTGGATGGATGTTGAGAGGCTGGG	112	100	agtcacagagctccct	1.08
KCNH2	Y611H	W4	ACGTTGGATGTCCTCACTCTGTGAGCTG	ACGTTGGATGCACATCCCTCTCCAG	114	100	ccctctccagctgcgccc	1.08
KCNH2	241insC	W4	ACGTTGGATGTAGCAACCCCTACACAGC	ACGTTGGATGCTGCTGAAGGTGAAGTAG	105	100	ccctccatcaagacaag	1.08
KCNH2	A558P	W4	ACGTTGGATGTGACACACCACTGGCAG	ACGTTGGATGGAGGCTTGCCTGGCGCG	118	100	ctccgctgcctctcgccgcg	1.08
KCNH2	1122nsC	W4	ACGTTGGATGTGCTGTGTGTATGCAAG	ACGTTGGATGTGTGCTGTGCTCATGTG	111	100	cttgctcatgtgcacottt	1.43
KCNH2	C86G	W4	ACGTTGGATGGAGGTGTGCAAGCAACC	ACGTTGGATGGAGGCTTGCCTGGCGCT	100	100	atgtgtagagagctgcgcccc	1.43
KCNH2	1498M	W4	ACGTTGGATGTAGCCACACTCGGTAGCAG	ACGTTGGATGTCTACAGGCTGCTCTAC	110	100	tgttgcaagcagaccctgcgac	1.43
KCNH2	G584S	W4	ACGTTGGATGTCCACACTCCCGCTGT	ACGTTGGATGTGTAGGCTTGCCTATCTGG	106	100	ggagaggcgggccttctcccc	1.43
KCNH2	F29L	W4	ACGTTGGATGTACGCGCACTCTCTCCGC	ACGTTGGATGTGTAGGCTTGCCTATCTGG	94	100	tgcacgttcagcctcagcgatc	1.77
KCNH2	E637K	W4	ACGTTGGATGTACGCGCACTCTCTCCGC	ACGTTGGATGTGTAGGCTTGCCTATCTGG	97	100	cccccctatggactcagcgatc	1.77
KCNH2	638-639delSN	W5	ACGTTGGATGCTCTACTTCACTCTCAGCAG	ACGTTGGATGTAGCATGACGAGATGG	119	100	ccicccccctagcgcgttaagtt	1.77
KCNH2	785delG	W5	ACGTTGGATGTACCCAGGATGCGCACGAC	ACGTTGGATGTCCCGCTGTACTCTATC	96	100	tctcacacacccaactcagaga	0.73
KCNH2	H562P	W5	ACGTTGGATGTGTGGCTGCTCCATGTTG	ACGTTGGATGCTTGCCTGTGCACTTTG	103	100	atctcgatgtagccgc	1.08
KCNH2	T65P	W5	ACGTTGGATGAGAGTGCCTGCGCGATCT	ACGTTGGATGGCGAGGTGTGACGCGA	113	100	atgcaggctagccag	1.43
KCNH2	D609N	W5	ACGTTGGATGTAGCAACCCCTACACAGC	ACGTTGGATGCTGCTGAAGGTGAAGTAG	105	100	gtgcaggagtcgcagag	1.77
KCNH2	L86R	W6	ACGTTGGATGACTGCGAGCTCTCTGCACG	ACGTTGGATGTTCCAGTTTGGCTCCTC	115	100	ggccccctcacaag	0.73
KCNH2	R922W	W6	ACGTTGGATGGGGGACGGCGAGTAGC	ACGTTGGATGATCTCCTACTGCTCTCAGGG	110	100	agatggcgagcgac	1.08
KCNH2	R823W	W6	ACGTTGGATGCTCTGAACCTGTATGCAAG	ACGTTGGATGGATCTGTGTGTATGCAAG	99	100	ccagtgagccggggc	1.43
KCNH2	V650A	W7	ACGTTGGATGCTCTACTTCACTCTCAGG	ACGTTGGATGATGAGCATGACGAGATGG	119	100	ttggccttcgggaagc	1.77
KCNH2	1032delC	W7	ACGTTGGATGTCAACATCCTCCCTCTCCAG	ACGTTGGATGCTCCCTCACTCTGTGAGCTG	113	100	ttgtctccagccgggt	0.73
KCNH2	Y611Sfp	W7	ACGTTGGATGCTGCTGAAGGTGAAGTAG	ACGTTGGATGTAGGCAACCCCTACACAGC	105	100	gtagagccgctcac	1.08
KCNH2	N470D	W7	ACGTTGGATGCTCTGGCATGTGACGTAG	ACGTTGGATGTAGGCACTCATGTGAGCATC	98	100	agttggtgcggaag	1.43
KCNH2	L87P	W7	ACGTTGGATGATTTCCACTTTGGCGCTCT	ACGTTGGATGCTTACTTCACTCTCAGCAG	115	100	tgccgtctcggcgccc	1.77
KCNH2	P632S	W7	ACGTTGGATGAATGAGCATGACGAGATGG	ACGTTGGATGCTTACTTCACTCTCAGCAG	119	100	atctgagttggtgtgg	1.77
KCNH2	Q81Sfp	W8	ACGTTGGATGATTTCCACTTTTGGCGTCTC	ACGTTGGATGCTGCGACTTTCGCTCAGC	115	100	gtgcctcgcgagct	0.73
KCNH2	T613M	W8	ACGTTGGATGTGGGCTGCTGAAGGTGAAG	ACGTTGGATGTAGGCAACCCCTACACAGC	110	100	gtmaagttagcgcc	1.08
KCNH2	N588K	W8	ACGTTGGATGCACATGGACTACGCACTG	ACGTTGGATGTAGGCTTGCCTATCTGG	83	100	tcggctgcctgcacaa	1.43
KCNH2	Y598H	W8	ACGTTGGATGCTTGCATGTGCACCTTTG	ACGTTGGATGTGTGCTGCTCAGATGTG	103	100	ggctagcctgcattcg	1.77
KCNH2	500del7N	W8	ACGTTGGATGCTCACTACTCTCAAGGGCTG	ACGTTGGATGATGAGCCAGAGACGAGATGA	101	100	tcaaaggccttggttcctc	0.73
KCNH2	P72Q	W9	ACGTTGGATGTGCAACCTCGCACTCTCTG	ACGTTGGATGTACTTGTCTTTGCGCTCTC	119	100	actctctgcacgggc	1.08
KCNH2	B93R	W9	ACGTTGGATGACATGCACTACGCACTCGG	ACGTTGGATGTACTTGTCTTTGCGCTCTC	120	100	actctggggcagcaga	1.08
KCNH2	824insG	W9	ACGTTGGATGCTCTGAACCTGTATGCAAG	ACGTTGGATGGATGTTGTGTAGTCAACG	100	100	acgggagtggtcgggg	1.43
KCNH2	L564P	W9	ACGTTGGATGCTTGCATGTGCAACCTTTG	ACGTTGGATGTGTGCTGCTCCTCATCTG	103	100	gctcatcggcagctggcg	1.77
KCNH2	N629S	W9	ACGTTGGATGCTCTACTTCACTCTCAGCAG	ACGTTGGATGCTTCTCTGAGTGTGTTGG	92	100	acgtgtgggcttcggca	1.77

Estudio genético de la muerte súbita cardíaca: Miocardiopatía Hipertrófica Familiar y Síndrome de QT Largo.

Gene	Mutation	Plex	1st-PCR Primer	2nd-PCR Primer	Amplicon Length (bp)	Concentration PCR primers (nM)	Extension Primer	Concentration Extension Primers (nM)
KCNH2	L599H	W10	ACGTTGGATGTTGTTGGCTGCTCCATGTTG	ACGTTGGATGTTGTTGCTTCTGCTCATGTGGACG	107	100	AGCAGTGGGGGATG	0.73
KCNH2	989delG	W10	ACGTTGGATGTTCTCGACGTCTCTCATCAG	ACGTTGGATGTCGCGTGGTGGCTTCTC	99	100	TCAGGGCTCCCCACC	1.08
KCNH2	85nfsN	W10	ACGTTGGATGTGCGAGCTTCTCTGACGGG	ACGTTGGATTTTCCACTTTTGGCTCTCG	120	100	CCGCGAGATCGGGAG	1.43
KCNH2	V625E	W10	ACGTTGGATGTCTACTTCACTTCACTTCAGAG	ACGTTGGATGTTCTTGAGTTGGTGTGG	92	100	TCAGACCTTCACAGTGG	1.77
KCNH2	74del31	W11	ACGTTGGATGGTTTCCCTCACTTGGGTTT	ACGTTGGATGATTCGCTCACTTGGCTCTC	107	100	CCGCGCTGGGCAC	0.73
KCNH2	S4285pL	W11	ACGTTGGATGACCTGGGACTTCTGCGACG	ACGTTGGATGATTCGCTCACTTGGCTCTC	115	100	CCGCGCGCGACGCA	1.08
KCNH2	L815V	W11	ACGTTGGATGCTCTTCCGCTCTCCCTCAG	ACGTTGGATGCTCTTCAAGACAGTATGTC	84	100	AGCAGAAAGGACGCG	1.43
KCNH2	C64Y	W11	ACGTTGGATGTCTGAGTTGGTGTGGG	ACGTTGGATGTCTGAGTTGGTGTGGG	117	100	GCTGAAGTGAAGTAGA	1.77
KCNH2	921delG	W12	ACGTTGGATGTATGCAACGACGAGCTTCTG	ACGTTGGATGGGCGCGTGCAGAGCTCTG	118	100	TGATGCAAGCGCCCT	0.73
KCNH2	141nfsC	W12	ACGTTGGATGGGAGGAGTGTGGCGCTTG	ACGTTGGATGGGAGGAGTGTGGCGCTTG	111	100	GGCGAGTAGCGGGG	1.08
KCNH2	V630L	W12	ACGTTGGATGAGCAAGTACACTTACCTGGG	ACGTTGGATGATGTAGAGAGGAGATGGTG	114	100	GTGTCTAGCCGGGG	1.43
KCNH2	A78P	W13	ACGTTGGATGCTCTCTGAGTTGGTGTGG	ACGTTGGATGCTCTTCACTTCACTTCCAGT	92	100	GTGGTGTGGAGAGA	1.77
KCNH2	295delG	W13	ACGTTGGATGACCTGCGACTTCTGCGACG	ACGTTGGATGTTTCCACTTTGCTGCTCTC	115	100	CGCAGCAGCGCGCG	0.73
KCNH2	L523S	W13	ACGTTGGATGGAGACATCGAGGCGATCG	ACGTTGGATGCTCACGGTGTCTGGCGTG	86	100	CATCGCGCGCGGGT	1.08
KCNH2	N635S	W13	ACGTTGGATGTACCNATGTCAGGCTAGCA	ACGTTGGATGTGCTACTCAGATAGAG	109	100	AAGGTGCATGAGC	1.43
KCNH2	H70R	W13	ACGTTGGATGCTCTACTTCACTTCACTTCAAGAG	ACGTTGGATGATGAGCATGACGACATAGG	119	100	AGCAAGCTCTCTCCCA	1.77
KCNH2	N33T	W14	ACGTTGGATGTATGATGACGACGCTGAC	ACGTTGGATGAGAGTGGCTGGCGGATCT	105	100	CTGGGACTTCTGCG	0.73
KCNH2	E444D	W14	ACGTTGGATGCTTAGGGCGTAAAGTTCATC	ACGTTGGATGAGAGCGGTCTGTGGAGTAG	95	100	AAGTTTCACTCGCCA	1.08
KCNH2	K638E	W14	ACGTTGGATGTGAAGAGAGCGGAAGAGG	ACGTTGGATGATGTGTCACGATGAGGTG	108	100	GGCGCGCTCTACCGA	1.43
KCNH2	9ds1G_C	W15	ACGTTGGATGTTTCCAGTCCAGTCCCGG	ACGTTGGATGCCCTGTACTTCTATCTCCCG	120	100	GGCCCCACCCCAT	1.77
KCNH2	W585C	W15	ACGTTGGATGCAACATGGAGCAGCCACACA	ACGTTGGATGTAGGGTTTGGCTATCTGG	97	100	CTCAGCATCGGCTG	0.73
KCNH2	G604S	W15	ACGTTGGATGCTGTGAAGTGAAGTAGAG	ACGTTGGATGTAGGCAACCCCTACACAGC	105	100	TCTTGATGAGGGCG	1.08
KCNH2	F627L	W15	ACGTTGGATGCTCTCTGAGTTGGTGTGG	ACGTTGGATGCTCTTCACTTCACTTCCAGCAG	92	100	CGGGAGAGAGTTGCC	1.43
SCN5A	IVS14as-TG_C	W1	ACGTTGGATGGGAGTCTTTCATCCCAAC	ACGTTGGATGTTGAAGTCACTCTCTGCTG	99	100	TTCTGCTCCCTCTCA	1.77
SCN5A	G1740R	W1	ACGTTGGATGCTCTGCCCAACAGCAATG	ACGTTGGATGTAGGTGGTGAAGAAGAG	97	100	ACAGCATGSGCTCTCG	0.73
SCN5A	P2006A	W1	ACGTTGGATGACAGTGAAGATCTGCGCGAG	ACGTTGGATGTTTTCAGTGTGCTCGGCG	116	100	GATCTCGCGACTTCGCC	0.73
SCN5A	K1236N	W1	ACGTTGGATGAGACATCTACCTAGAGAG	ACGTTGGATGCGCAGAGACATATGTGAC	101	100	GGAGCGAAGACCATCA	0.73
SCN5A	E1053K	W1	ACGTTGGATGAGGCTGTCTCTCATCTTC	ACGTTGGATGATCAGAGCCGCTGTGTGTG	99	100	TGCTATCTGTGCTGACT	1.08
SCN5A	A997S	W1	ACGTTGGATGATTCTGCTGTGCTCTCTG	ACGTTGGATGATGACGCTGGCGAGCTGG	100	100	CGAAGCCGACGCCCTTGCC	1.08
SCN5A	R182H	W1	ACGTTGGATGAGGCTATCTGTGTTGGG	ACGTTGGATGTAGTATTCGGTCTGTCTG	101	100	TCGTGTTGGCTTGGCGATA	1.08
SCN5A	A185T	W1	ACGTTGGATGTCTGGTCAAGATCTGTGGCT	ACGTTGGATGATTAAGTACGACGAGTTCC	102	100	TCGTGAGGCTTGGCTGAC	1.08
SCN5A	W1585p	W1	ACGTTGGATGTATGTGGTCAACCATCTC	ACGTTGGATGTCGAGAGTACTCACTDGC	111	100	aaGAGACGACCTCCACCCCTG	1.43
SCN5A	W1951L	W1	ACGTTGGATGGTGGGAGAGAGTCTCTAC	ACGTTGGATGTCGAGAGAGAGTGGCCCTGA	88	100	aaGAGAGAAAGTTCTCAGCTCATCA	1.43
SCN5A	861delTT	W1	ACGTTGGATGTCTAGCCATCATCTGTCTC	ACGTTGGATGTCTAGCCATCATCTGTCTC	96	100	gttGGTGGGATGTCAGCTCT	1.43
SCN5A	196nfsN	W1	ACGTTGGATGATAAATCTAGTGGCTCTTGG	ACGTTGGATGTGAGGACGACTCGCATATG	90	100	ggcAAATCTCCCAATCTCAT	1.43
SCN5A	A1824T	W1	ACGTTGGATGTGTTTCCAGAGGCTCTC	ACGTTGGATGCTGTGACGAGAGGAGA	99	100	ctCTGCACTCTCTTGAAGCAT	1.77
SCN5A	1500delN	W1	ACGTTGGATGAGGACGAGAGAGTACTAC	ACGTTGGATGAAACACGAGAGGCTGCTCA	118	100	aggcAGTACCATGCTCCATGAG	1.77
SCN5A	R1203V	W1	ACGTTGGATGCTGAGTCACTTGAAGATG	ACGTTGGATGCGAGTACTTCTCTCCG	99	100	ggpbcGGCGCAGCGGGATGACTC	1.77
SCN5A	I230V	W1	ACGTTGGATGAATGCTCAAGCTTACGCGAC	ACGTTGGATGTAGCGTGGGTGTAAGCT	112	100	tcAGTCTCGGGCGCTGAAACCT	1.77
SCN5A	1775delT	W1	ACGTTGGATGTATGGAAGTCTGCTCACTC	ACGTTGGATGTACATTCATCATCTCTG	101	100	gggatCTCTCCGTGGCGACGCTGA	1.77
SCN5A	R340Q	W1	ACGTTGGATGAAGTCTCTGTGTGGCTG	ACGTTGGATGAAGTCTCTGTGTGGCTG	117	100	ggagAGACATGTCCGAGGGCTACC	1.77
SCN5A	941delCTnfsAA	W1	ACGTTGGATGGTGTCTATCTCTCTGCTC	ACGTTGGATGATATATTTTCTTACGGGCGCG	104	100	ctgCTGTGAGTGTCTGTGACTGAAG	1.77
SCN5A	T220I	W2	ACGTTGGATGATTTGTGGACCTGGGCAATG	ACGTTGGATGATTTGTGGACCTGGGCAATG	89	100	TGTCCTAGGCTTAGCCA	0.73
SCN5A	S910L	W2	ACGTTGGATGATCTTCCGCGATCTCTG	ACGTTGGATGAGCAGCAGGCAATATGAC	108	100	GGACTGCATGGAGGTGT	0.73
SCN5A	T512I	W2	ACGTTGGATGGCTCTATAGAAGTCTTGCTG	ACGTTGGATGAGAGCAGCATGTCTGTGCTG	110	100	atCTCTGTGAGGCCACGG	0.73

Gene	Mutation	Plex	1st-PCR Primer	2nd-PCR Primer	Amplicon Length (bp)	Concentration PCH primers (nM)	Extension Primer	Concentration Extension Primers (nM)
SCN5A	R171delG	W2	ACGTTGGATGTTCAACTCTCCAGACCTTCGCG	ACGTTGGATGTTGGAGTGGGGCTGAG	114	100	CTTCAGATCACACGCTG	0.73
SCN5A	R1232W	W2	ACGTTGGATGTTCTATGTCACACCTGTGCTG	ACGTTGGATGTCACGACACCTGTATGG	107	100	GGACATCTACCTAGAGGAG	1.08
SCN5A	M389K	W2	ACGTTGGATGAGCTTGATGATCTCTTGCTG	ACGTTGGATGTCACACACCTGCTGATAGG	109	100	aagTGGACCTCTCCGCGTGA	1.08
SCN5A	R1432G	W2	ACGTTGGATGAGAGAGCCACTGTGGACCC	ACGTTGGATGCCAGACACCTCTTAAAGAG	102	100	aacTGTGGCAACTCACCCTCC	1.08
SCN5A	E35insAs	W2	ACGTTGGATGCAAGGCATAGCACAGATAG	ACGTTGGATGTGAACATGCTGGACTTTAG	93	100	AGCATAGCAATAGATACCTT	1.43
SCN5A	P1332L	W2	ACGTTGGATGACTTGAGGTGGTGTCAATG	ACGTTGGATGTGAAGCAGAGAGTAACTAC	106	100	ccTGCCTGGTGGGCGCATCC	1.43
SCN5A	G1502S	W2	ACGTTGGATGGAGCAGAGAGAGAACTAC	ACGTTGGATGTCTCCAGAGCTTACAC	118	100	ggaaAATGCCATGAAGAAGCTG	1.43
SCN5A	R1405L	W2	ACGTTGGATGGAGCAGAGAGAGAACTAC	ACGTTGGATGTCTCCAGAGCTTACAC	99	100	cgGTGAAGTCAACTTTGACAAC	1.43
SCN5A	R1023H	W2	ACGTTGGATGTGCTATGCCACCCCTACTC	ACGTTGGATGTGCCAGTCTCTCAAGC	110	100	cccCGGAAGTGCCTCCCAACC	1.43
SCN5A	S1787N	W2	ACGTTGGATGTCTCTGGAGCACTCAAG	ACGTTGGATGTGCCAGTCTCTCAAGC	110	100	agggCGGAGCAGCCGACCCCTGA	1.77
SCN5A	G1319V	W2	ACGTTGGATGTGGGCCCACTCAAGTCAC	ACGTTGGATGTGCCAGTCTCTCAAGC	118	100	ggGAGGCTCTGTACGATTTGAGG	1.77
SCN5A	I239V	W2	ACGTTGGATGCGTGTCTTCTTCGCTTC	ACGTTGGATGATCAGCCACTCTCTCAC	100	100	cgTGCCTCCCAAGGCTGAAGAC	1.77
SCN5A	R104Q	W2	ACGTTGGATGCCAGACTTCATCTACTG	ACGTTGGATGGAGTGAAGACATCAAG	101	100	ggAAATAAGCAAGCAACCTCTCC	1.77
SCN5A	S1812Sip	W2	ACGTTGGATGATAGGAGTGGCTCAGACAG	ACGTTGGATGAATTTGACAGAGGCCAC	103	100	ggCATCGCAAACTCAGACAGGAC	1.77
SCN5A	T1620M	W2	ACGTTGGATGTCTGGACATCATCAGAGAG	ACGTTGGATGTGGATCAGTCTGAGGATGC	112	100	caaGCAGAGTACTCTCTCCCGA	1.77
SCN5A	R367C	W3	ACGTTGGATGAGCTTCGATCTCTTGCTG	ACGTTGGATGATCAGCTCTCTTGCTG	109	100	CTTCTTGACACTCTC	0.73
SCN5A	E867Sip	W3	ACGTTGGATGTGGAGCTCTTTGGCAAGAC	ACGTTGGATGGAGTGCATCATGTGGCAG	101	100	TTGGCAAGACTACTCG	0.73
SCN5A	R535Sip	W3	ACGTTGGATGGCAAACTGTCTTCAGAAC	ACGTTGGATGTCTATGAGCCACGTTCC	99	100	CTTCAGAACCCAGGCTC	0.73
SCN5A	R1644H	W3	ACGTTGGATGGATCAATCAGGCGAAAGAG	ACGTTGGATGTAGCCGCTCTCTCAGAC	92	100	ggGGCAAGCAGCAGCTG	0.73
SCN5A	G298S	W3	ACGTTGGATGAGTAAAGTCCAGGGAATC	ACGTTGGATGGCACTTCAAGAGCTCTGCTC	99	100	AGGGATCCGAGCAAGC	1.08
SCN5A	T187I	W3	ACGTTGGATGACTAAAGTCCAGCAGTTCC	ACGTTGGATGTGGTCAAGATTTGCGCTC	102	100	ggCATGGTCCCGAAGGAA	1.08
SCN5A	4E5del20N	W3	ACGTTGGATGACAGAGACTCAAAAGTG	ACGTTGGATGTAGCCCTCCCTAAGAAC	102	100	AAAGGTAAATGGCGGTGA	1.08
SCN5A	E1240Q	W3	ACGTTGGATGGCAAGACATATGTGAAC	ACGTTGGATGTCTCCACAGTAACTG	101	100	tgacCATCTGTGGCATACT	1.08
SCN5A	G319S	W3	ACGTTGGATGCCTCACCAGCATGATGTTTC	ACGTTGGATGCTTCCACAGATACAC	100	100	AGAAATTAACCTGCTCAAGAC	1.43
SCN5A	V1763M	W3	ACGTTGGATGTCTCTTCCACACCTAC	ACGTTGGATGAGTTCAGGATGATGGC	99	100	agagCATCTCTGCTCTCATC	1.43
SCN5A	A691T	W3	ACGTTGGATGAGTTCACCATCTCGAAG	ACGTTGGATGCTTGAAGACATCCACG	99	100	tcCCACCATGCTGGAACCGTCTC	1.43
SCN5A	D1790Q	W3	ACGTTGGATGTCTCCAGATCATAGAAC	ACGTTGGATGCTCTGAGACTCTACG	110	100	AGATCTATAGAACAATCGAAG	1.43
SCN5A	V411M	W3	ACGTTGGATGATGTGGCTTGATTTGCTC	ACGTTGGATGGTCTCTACTGCTGAGC	93	100	caaCTATAGGCATTGCGACCA	1.77
SCN5A	N1325S	W3	ACGTTGGATGATGATGCCACAGATGAGG	ACGTTGGATGATCTCTCTCACTTGAGG	118	100	ggagGGATGGCGCCCAACAGGGCA	1.77
SCN5A	IVS22del27_C	W3	ACGTTGGATGTCCACACTCCCTGTGGGAA	ACGTTGGATGGAGCTCTGTACAGATTG	88	100	tgTGGGAAGGCAAGCCACTCTCTT	1.77
SCN5A	D1595N	W3	ACGTTGGATGGCCACTACTACTACCAAC	ACGTTGGATTTGATACCAACCTGATGTAAC	98	100	cccGACCAACAGCTGGAAATCTCTC	1.77
SCN5A	K126E	W3	ACGTTGGATGAACAGCTTGTATGCTCCAG	ACGTTGGATGGAAGGATATGATGTAAC	99	100	ggacCCCACTCGGAGAGCGCTGTG	1.77
SCN5A	L408R	W3	ACGTTGGATGAACAGAGTGAAGTCAAC	ACGTTGGATGTCTTCCAGCACTTACCAC	99	100	agggGAAATCAACTTTGACAACGTG	1.77
SCN5A	L1501V	W4	ACGTTGGATGAACACAGGAGCTGCTCAC	ACGTTGGATGAGAGCAAGAGTACTAC	118	100	GGCTTTCTGGAGGCCA	0.73
SCN5A	G752R	W4	ACGTTGGATGTGTGAATTCGAGGATGCTG	ACGTTGGATGTCCAGGATGGCAATTTGAG	98	100	AGGATGTGCTCGAGGTC	0.73
SCN5A	R225S	W4	ACGTTGGATGAATGTCTCAGCCTTACGCAC	ACGTTGGATAGCCCTTGGTGTCTTACG	112	100	CGCACCTTCGAGTCTCTC	0.73
SCN5A	Q118Sip	W4	ACGTTGGATGAAGGATGATACCTCAC	ACGTTGGATGATCTCTCAAGCCGACT	100	100	TGGGTTCCGCTTTCTCACT	0.73
SCN5A	I1768V	W4	ACGTTGGATGTCTCTTCTCCACACCTAC	ACGTTGGATGCTGAAGTCTCCAGATG	104	100	gATCTGTGTCAACAATGATC	1.08
SCN5A	R891	W4	ACGTTGGATGGAGCTCTCTTGCGAGTCC	ACGTTGGATGATGAGTCCCACTGTGCTC	95	100	TTATGCTCTCTCATCTC	1.08
SCN5A	868delG	W4	ACGTTGGATGTGAGCTCTTTGGCAAGAC	ACGTTGGATGATGATCATCATGTGCCAG	101	100	TTGCAAGACTACTGGAG	1.08
SCN5A	R190G	W4	ACGTTGGATGTCTGGTCAAGATCTGGCTC	ACGTTGGATGATCAAGTCCAGCCAGTTCC	102	100	aggCAGCGGTCACTTCTCTT	1.08
SCN5A	39del3N	W4	ACGTTGGATGTCAAGTTTCACAGGTGAAG	ACGTTGGATGTCCGAGGAGAGATCTACAT	93	100	aGAGATGACAAGCATGAAGA	1.43
SCN5A	K317N	W4	ACGTTGGATGGCTTCAACAGATGATGTTTC	ACGTTGGATGTCTTCCCAACAGTAACTAC	100	100	TACAGAAATTAACCTGCTCAA	1.43
SCN5A	H81P	W4	ACGTTGGATGAGCACTCCAGATCAGGTAG	ACGTTGGATGATCACTCACTGGCTGTGCC	120	100	ITTCAGAGATGGTGGACACTTG	1.43
SCN5A	IVS2del-24C_T	W4	ACGTTGGATGCATACGATGAAGTCTGGG	ACGTTGGATGCCAAAGCTGCCCCAAAG	95	100	CTGGGACAGACAGTAGCATG	1.43
SCN5A	G514C	W4	ACGTTGGATGCCCTTAGAATCATCTCAGCC	ACGTTGGATGAAAGTGAATAATGCTCCGCG	105	100	tgGAATCATCTCAGCTCACCGCT	1.77

Estudio genético de la muerte súbita cardíaca: Miocardiopatía Hipertrófica Familiar y Síndrome de QT Largo.

Gene	Mutation	Plex	1st-PCR Primer	2nd-PCR Primer	Amplicon Length (bp)	Concentration PCH primers (nM)	Extension Primer	Concentration Extension Primers (nM)
SCN5A	IVS24del28C_T	W4	ACGTTGGATGAGATGGCAGACGACTGCTCCG	ACGTTGGATGTAGGTTGGCAGCAGTGGCTTC	105	100	CCAGGAGCTCAGGTGGCTGACTT	1.77
SCN5A	G35S	W4	ACGTTGGATGATCGAGAGCGCATGGCAGA	ACGTTGGATGTCTCGGCTCTGCGACTG	82	100	gggcATGGCAGAGAAGCAGGCCGCG	1.77
SCN5A	G61E5	W4	ACGTTGGATGGGTGGTGTCTCATTAACATGGG	ACGTTGGATGGTGTCTAGCATACAGAGG	102	100	gggACCCAGAGGCCACATCCGCCAG	1.77
SCN5A	1479del6N	W4	ACGTTGGATGATGCTTCTTCAACCTGAAACCTC	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	110	100	CTTGTCTGACGCCCTTC	0.73
SCN5A	E1225K	W5	ACGTTGGATGCTTCATGTCACAGCTGTCTG	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	100	100	TCGGAGCTGACTTGATG	0.73
SCN5A	P1298L	W5	ACGTTGGATGAATGTGTGACAGAGCTCTCAG	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	106	100	TCGGAGCTGAGGAGACAG	0.73
SCN5A	871 delC	W5	ACGTTGGATGTGAGCTCTTTGGCAAGAAC	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	101	100	gGGCTCTCCGAGTCAAC	0.73
SCN5A	R1626P	W5	ACGTTGGATGCCAAGACTTCTCTCTCC	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	99	100	AGTCAACTTTGACAACGTTG	1.08
SCN5A	G1406R	W5	ACGTTGGATGGCAGCAAGGTGAAGAACTCAAC	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	100	100	AGTCAACTTTGACAACGTTG	1.08
SCN5A	E555K	W5	ACGTTGGATGGCAGCAAGGTGAAGAACTCAAC	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	100	100	agggCCTCTGGCTTCTCTCT	1.08
SCN5A	E4735Tp	W5	ACGTTGGATGTGCTCTCTGGAACATCCG	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	100	100	agggCCTCTGGCTTCTCTCT	1.08
SCN5A	S1982I	W5	ACGTTGGATGGGCTTGGACTACACCATCG	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	97	100	ACACCTCGTGAACAACAAGA	1.08
SCN5A	E1784K	W5	ACGTTGGATGCATATGAGATGCTCTCAC	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	100	100	cccGCTCTCACTCAGGGGCT	1.43
SCN5A	D356N	W5	ACGTTGGATGGGGAAGATGCAAGAAAG	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	101	100	afaaAGGCCAGGCAAGGAAT	1.43
SCN5A	O92K	W5	ACGTTGGATGATGTCCACATCTGTGAGC	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	99	100	fgaaATGCTGGAACGCTCTCGCC	1.43
SCN5A	E2727ins4N	W5	ACGTTGGATGTCTCCGCTCACTGACTG	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	86	100	cdgCTGACTGTATACCCACCAC	1.43
SCN5A	IVS25delG_A	W5	ACGTTGGATGAGAGGATACACACAGATG	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	91	100	ACAGCATAGAAATGAGATACCTTA	1.77
SCN5A	E161K	W5	ACGTTGGATGGAGAGGAGGCTCTGAGATA	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	104	100	cccGAGGGCCTGAAGATACTCACT	1.77
SCN5A	1468del4N	W5	ACGTTGGATGGAGCTGGTGTCTACGATC	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	104	100	fggGTTGGTGAAGTTGTCAATGA	1.77
SCN5A	R27H	W5	ACGTTGGATGTCTGCAAGGTGGTTGAGC	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	109	100	aggAGGGGCTTGGCTTCTCGCATG	1.77
SCN5A	A226V	W5	ACGTTGGATGAATGTCTAGCCTTACGGAC	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	112	100	cccAAGCGACCTTCGAGATCTCGCATG	1.77
SCN5A	C896S	W5	ACGTTGGATGTGCTCTCTCATCATCTCC	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	118	100	TCATCTTCGGCATCTCT	0.73
SCN5A	L567Q	W6	ACGTTGGATGACATCTCTGCTGGTCCCT	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	120	100	GCTGTGCTCGCTCGGCC	0.73
SCN5A	1504del9N	W6	ACGTTGGATGACCTCCACAACCCAGGAC	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	108	100	CGTGGATGGGCTCTCT	0.73
SCN5A	R367H	W6	ACGTTGGATGAGCTTCGATCTCTTTGGCTG	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	109	100	ggcTTCTTGACCTCTCC	1.08
SCN5A	G1743E	W6	ACGTTGGATGTGAGTGGTGAACAAGAGG	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	97	100	GATGCCAGGCTGGGCTC	1.08
SCN5A	L1825P	W6	ACGTTGGATGAGAGGCTTACTCTCTCCG	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	101	100	gTTCGCGAGCGCTCTCC	1.43
SCN5A	R1623DL	W6	ACGTTGGATGTGAGTGAAGAGCACTCGAT	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	99	100	GAGGACGACTCGATATGTTG	1.43
SCN5A	Y1795H	W6	ACGTTGGATGACCATCACTATGTGATCG	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	90	100	GTACTCAACACTCTCATG	1.43
SCN5A	A736V	W6	ACGTTGGATGAGTGAAGAGCTTCTCCCG	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	120	100	GAGCCAGCTTCAGAGCTCTCGA	1.77
SCN5A	I1968S	W6	ACGTTGGATGAGTGAAGAGCTTCTCCCG	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	118	100	GGCCAGGTGTCCAGGACTGGCT	1.77
SCN5A	S1103Y	W6	ACGTTGGATGTCTTGCCCTCATGATGCC	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	110	100	acCATGGGCTGTGCTCTCTCTC	1.77
SCN5A	V1667I	W6	ACGTTGGATGTGAGTCTCTGAACTGAGCC	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	120	100	TCATGGGAGTGTGACTGACCA	1.77
SCN5A	1397del4	W6	ACGTTGGATGTGAGTCTCGAGTAGTCTTG	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	101	100	GCATGCCACACAGCAAGATGA	1.77
SCN5A	F862S	W6	ACGTTGGATGTGCTCTGCTGGAGATG	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	117	100	atATGCTGCTCAAGTGGGTGGCCTAC	1.77
SCN5A	G1295L	W7	ACGTTGGATGCTCTCTCTCCACACCTAC	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	99	100	TCTCATCTGTGTCAAC	0.73
SCN5A	D1768L	W7	ACGTTGGATGCTCTCTCTCTCTCTCTCT	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	100	100	ATGCCGTGTGCTGGCTC	0.73
SCN5A	R955C	W7	ACGTTGGATGAGAGGACACAGCAAAATC	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	113	100	ccAGGCCCTCTGGATGC	1.08
SCN5A	R1189Q	W7	ACGTTGGATGAGTGTCTCGACACGCTGAC	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	113	100	GTAGAGGCTTGGGCAC	1.08
SCN5A	G351V	W7	ACGTTGGATGAGGCAAGAAATCAAGCTG	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	115	100	AGGAATGAAGCTGGTGTAG	1.43
SCN5A	V294M	W7	ACGTTGGATGAGCACTTCAAGCCTCTCAAC	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	99	100	CTCAACGGCACCAACGGCTCC	1.43
SCN5A	F1250L	W7	ACGTTGGATGTCTGCTTGAAGCTGTGAG	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	109	100	GACAAGATGTTCACATATGTC	1.77
SCN5A	A1390TP	W7	ACGTTGGATGAGTGAAGGCAAGATGAGG	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	106	100	ACGTTGATGGACGGGATGG	1.77
SCN5A	F1293S	W7	ACGTTGGATGATTTCTATTGCTTCCCTCCCG	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	112	100	CTTGTGGCAACACCTGGGCT	1.77
SCN5A	Y1795C	W7	ACGTTGGATGTGAGTGAAGGACGACTCGAT	ACGTTGGATGAGACCTGGGAGTGGTGTCTCT	90	100	GTGAGGACGACTTCGATATGTTCT	1.77

Gene	Mutation	Plex	1st-PCR Primer	2nd-PCR Primer	Amplicon Length (bp)	Concentration PCR primers (nM)	Extension Primer	Concentration Extension Primers (nM)
SCN5A	T1645M	W7	ACGTTGGATGAATAGCGCGCATCTCAGAC	ACGTTGGATGGGACATCATGAGGGCAAAAG	94	100	ggctcaggggcccaaggggatcgcgca	1.77
SCN5A	H558R	W8	ACGTTGGATGTGATGAACACACACAGCGG	ACGTTGGATGCTGTCTCTGGGCACTGGTC	111	100	GGAGAGCGAGAGCCACC	0.73
SCN5A	R376H	W8	ACGTTGGATGACACTGTCTGCTCCCTGTGG	ACGTTGGATGTTGCACTCTTCCGCTGATG	105	100	ACACACCTGCTGATAGAGG	1.08
SCN5A	R1512W	W8	ACGTTGGATGAATGCCATGAAAGAACTGGG	ACGTTGGATGCTCCCAACAAACAGAGAGC	106	100	AGCCCCAGAAAGCCCATCCCA	1.43
SCN5A	R282H	W8	ACGTTGGATGAGGGGATCCAGACCAAGC	ACGTTGGATGGGGTGGTCTTAGGCACAAG	114	100	CGTTTGAGCGCTGTGAAGTTG	1.77
SCN5A	L619F	W8	ACGTTGGATGAGGGTGTCTAGACATCACAG	ACGTTGGATGGGGTGGTCTCAATTACTGGG	104	100	ggggatagcatcacaggggggga	1.77
SCN5A	T1304M	W8	ACGTTGGATGAGATGGGCCCCATCAAGTCA	ACGTTGGATGCATGGCCCTCAATCGTGAC	98	100	ggggcccatcaaaagtcactgcgga	1.77
SCN5A	R1644C	W8	ACGTTGGATGAATAGCGCGCATCTCAGAC	ACGTTGGATGTTCTACTTTGCCCTCCGCC	112	100	CTTGA TGGGGCCCATCT	0.73
SCN5A	E1295K	W9	ACGTTGGATGTCCGCACTGACTTACTGGG	ACGTTGGATGGTGTCTAGCATCAGAGG	102	100	acCATCCCGCGGACCCAGTG	1.08
SCN5A	L618F	W9	ACGTTGGATGGGTGTCTCTACTACTGGG	ACGTTGGATGTTCTTTGGCATGGAGGGCG	120	100	gaaCCTGCGCGGACCCAGTG	1.43
SCN5A	A572D	W9	ACGTTGGATGACATCACTGCTGTGCCCTG	ACGTTGGATGTTCTCTTCCCTGTCCCTC	100	100	ccgAC TTTCTCTATCGTAGAC	1.77
SCN5A	IVS21delTG_A	W9	ACGTTGGATGACATTCACCAATGCGCTGGTG	ACGTTGGATGATATCGAAGTCTGCTCTCAC	100	100	agag TCCTGGAGAACTTCAGC	1.77
SCN5A	V1777M	W9	ACGTTGGATGACATTCGCAATCATCTCTGGAG	ACGTTGGATGATATCGAAGTCTGCTCTCAC	100	100	agag TCCTGGAGAACTTCAGC	1.77
SCN5A	1617del8N	W9	ACGTTGGATGTCGCGATCAGTCTGAGGATGC	ACGTTGGATGTCGCGACATCATCCAGAAAG	112	100	tcgAAGAGCGCTCGGGGAGAAG	1.77

3. Bloque 3:

3.1. Artículo 4: Identification of a Novel MYBPC3 Gene Variant in a patient with hypertrophic Cardiomyopathy.

Este artículo, publicado en *Annals of Clinical & Laboratory Science*, recoge el análisis genético llevado a cabo en un paciente italiano diagnosticado de MCH y de su familia formada por 13 individuos. La detección de 658 variantes genéticas conocidas implicadas en el desarrollo MCH de se llevó a cabo mediante espectrometría de masas en la plataforma Sequenom MassARRAY® System. Además de la detección de variantes genéticas conocidas se llevó a cabo la secuenciación directa de los principales genes sarcoméricos implicados en el desarrollo de MCH: MYBPC3, MYH7, TNNT2, TNNI3 y TPM1 en el caso índice de la familia. Mediante la secuenciación directa se detectó una única variante *de novo* en el último residuo aminoacídico del exón 21 de MYBPC3: G13999T (Gln689His). Se trata de un residuo altamente conservado que no ha sido descrito como polimorfismo. La mutación resultó estar ausente en 122 individuos y por tanto en 244 alelos en controles sanos de población general italiana.

Identification of a Novel MYBPC3 Gene Variant in a Patient with Hypertrophic Cardiomyopathy

Maria Brion,^{1,2} Catarina Allegue,² Rocío Gil,² Alejandro Blanco-Verea,^{1,2} Angel Carracedo,² Erika Pagannone,³ Anna Evangelista,⁴ Sara Di Castro,⁴ Simona Marchitti,⁴ Rosita Stanzione,⁴ Massimo Volpe,^{3,4} and Speranza Rubattu^{3,4}

¹Hospital-University Complex of Santiago, Santiago de Compostela, Spain; ²Genomic Medicine Group, University of Santiago de Compostela, Ciberer, Spain; ³Department of Cardiology, IInd School of Medicine, University of Rome Sapienza, Ospedale S. Andrea, Rome, Italy; ⁴IRCCS Neuromed, Polo Molisano, University of Rome Sapienza, Pozzilli, Italy

Abstract. Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is a genetic disorder characterized by cardiac hypertrophy caused by mutations in sarcomere protein genes. MYBPC3 mutations are reported as a frequent cause of HCM. We aimed to identify the gene mutation underlying HCM in an Italian patient and his family composed of 13 relatives. Mutation screening of 658 known mutations was performed using a rapid and efficient mutation detection system based on semiautomated MALDI-TOF mass spectrometry using the Sequenom MassArray System and iPLEX Gold genotyping chemistry. Subsequently, direct sequencing of the coding exons and flanking intronic regions was performed for the most suitable HCM genes (MYBPC3, MYH7, TNNT2, TNNI3, and TPM1) in the index patient. We found a novel MYBPC3 gene mutation: G13999T (Gln689His). No other sarcomere gene mutation was found in this family. This genetic variant, which changes the last amino acid of MYBPC3 exon 21, affects a highly conserved residue. Furthermore, the Gln689His does not appear in public databases and has never been described as a polymorphism. The potential pathogenic role of this novel mutation was underlined by its absence in a sample of healthy subjects (n = 122) from the general Italian population. In summary, a novel MYBPC3 gene mutation has been identified in a patient affected by HCM, whereas it was absent in 244 reference alleles.

Keywords: cardiac hypertrophy, myosin binding protein C, gene mutation

Introduction

Familial hypertrophic cardiomyopathy (HCM), a monogenic disease with an autosomal dominant Mendelian pattern of inheritance, is due to mutant sarcomeric proteins: beta-myosin heavy chain (MYH7), cardiac troponin T (TNNT2), troponin I (TNNI3), cardiac alpha-actin (ACTC), alpha-tropomyosin (TPM1), myosin binding protein C (MYBPC3), regulatory myosin light chain (MYL2), essential myosin light chain (MYL3), and titin (TTN) [1,2].

Address correspondence to Speranza Rubattu, M.D., Dept of Cardiology, Ospedale Sant'Andrea, Via di Grottarossa 1039, Rome, Italy; tel 39 06 3377 5561; fax 39 06 3377 5061; e-mail: rubattu.speranza@neuromed.it.

Mutations of the MYBPC3 gene represent the most frequent cause of HCM. In particular, MYBPC3 mutations have generally been associated with a late onset, a relatively benign course, and a low disease penetrance [3-5]. However, this notion has been recently challenged by the observation that MYBPC3 gene mutations can be associated with adverse cardiac events such as progressive heart failure, stroke, and sudden death, even at a young age [6]. Novel MYBPC3 mutations have been reported in affected families from diverse populations [4,7] although the observation that a few of them can also be identified in normal reference alleles has diminished their potential pathogenic relevance.

Families affected by HCM show great variability in hypertrophic expressivity. In fact, presence of the responsible gene mutation may not necessarily be associated with the disease phenotype, or the clinical presentation can be very mild. This observation suggested the hypothesis that modifier genes contribute to the phenotypic expression of cardiac hypertrophy in HCM. Evidence of their existence has recently been obtained [8].

Delineation of the genetic basis of HCM contributes to deeper understanding of the pathogenesis underlying cardiac hypertrophy and it may improve the diagnosis, prevention, and treatment. Here we report genetic screening performed in an affected Italian patient and his kindred, with the identification of a novel MYBPC3 gene mutation.

Materials and Methods

Study subjects and clinical characteristics. We identified a 48 yr-old patient affected by HCM. The clinical manifestation of the disease started at the age of 37 yr with palpitations and dizziness. EKG monitoring revealed episodes of paroxysmal atrial fibrillation. Echocardiographic examination revealed increased ventricular septum thickness. Treatment with amiodarone and verapamil was started. At the time of his initial visit to our clinic (2006), the patient appeared in good clinical condition, asymptomatic, and without arrhythmias on EKG monitoring. Echocardiographic examination performed by a standard procedure with a phased array sector scan (Acuson Sequoia) using a multifrequency probe at 2.5, 3.5, or 5 MHz, revealed marked hypertrophy of IVS (23 mm), altered diastolic function with preserved systolic function (EF = 60%), and left atrium enlargement (50 mm). A pattern of nonobstructive HCM was diagnosed. A second visit, in 2009, did not show significant impairment of cardiac function. The patient was asymptomatic for the past two yr under regular medical treatment.

The proband's father had died at the age of 75 yr, being likely affected by HCM, based on information reported by relatives. The patient had three brothers (Table 2; Fig. 1, top): the oldest (56-yr-old) had echocardiographic evidence of concentric hypertrophy in the presence of untreated, mild arterial hypertension, assessed by standardized ambulatory blood pressure monitoring (ABPM); the second one (51-yr-old) had evidence of concentric remodelling, being diagnosed as hypertensive by ABPM (without current antihypertensive treatment); the youngest (35-yr-old) had developed an increase of LV wall thickness during the past 3 yr in the absence of hypertension. Hypertension was also excluded in the proband.

There were seven young subjects in the last generation of the kindred: six females and one male. Six of them (all except one female) were clinically evaluated and underwent echo-

cardiographic examination. They were all in healthy clinical condition. None showed echocardiographic signs of HCM.

To perform genetic screening, 5 ml of blood was obtained from each member of the family, with informed written consent. The study protocol was approved by the Institutional Review Board.

Mutation screening. DNA extraction was performed by a standard phenol/chloroform/isoamyl alcohol method. DNA quantification was performed using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. All family members were screened for known mutations located in coding or regulatory regions of MYH7 (GenBank accession number M57965.1), MYBPC3 (U91629.1), TNNT2 (NM_001001430.1), TPM1 (NG_007557.1), TNNI3 (X90780.1), MYL2 (NG_007554.1), MYL3 (NG_007555.1), ACTC (NG_007553.1), TCAP (telethonin; NM_003673.2), CSRP3 (lim domain protein; NM_003476), and TTN (AC023270.7). Mutation screening was performed by a rapid and efficient mutation detection system based on semiautomated MALDI-TOF mass spectrometry using the Sequenom MassArray System and the iPLEX Gold genotyping chemistry. A total of 658 mutations located in 16 genes were analysed as described by Brion et al [9]. Mutations were grouped in 31 multiplex reactions, analyzing between 10 and 24 mutations in each of them (Table 1). Mutations were selected based on both the available databases and the literature; a few mutations were described by a collaborating research group by direct sequencing and were personally communicated.

PCR and single base extension primers were designed using MassARRAY assay design 3.1 software (Sequenom MassArray system) that allows iPLEX reactions for SBE designs with the modified masses associated with the termination mix. Manufacturer's instructions for multiplexed reaction were followed in the whole process, including PCR amplification, shrimp alkaline phosphatase (SAP) enzyme treatment to dephosphorylate dNTPs unincorporated in the PCR, Single Base extension reaction using an iPLEX GOLD assay, and cleaning with a resin kit to desalt the iPLEX reaction products. PCR and SBE primers sequences as well as all protocol conditions are available upon request.

Table 1. Sarcomere gene mutations screened in the study subjects

Sarcomeric genes	Mutations	Other genes	Mutations
MYH7	280	PRKAG2	4
MYBPC3	249	TCAP	3
TNNT2	45	GLA	1
TNNI3	35	MYO6	1
TPM1	14	MYLK2	1
MYL2	14		
MYL3	11		
ACTC	10		
TTN	10		
MYH6	6		
TNNC1	4		

Reaction products were dispensed onto a 384-element SpectroCHIP bioarray using a MassARRAY Nanodispenser; mass differences were detected with MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry). MassARRAY Workstation v.3.3 software was used to analyse the iPLEX SpectroCHIP bioarray. Typer Analyzer v.4.0.2 software was used to analyze all genotypes obtained with the various assays.

Sequencing. Based on negative results of mutation screening, and in an attempt to identify the possible disease-causing mutation in our HCM patient, we performed direct sequencing of the coding exons and flanking intronic regions of the most suitable HCM genes: MYBPC3, MYH7, TNNT2, TNNI3, and TPM1. To check for cosegregation with the disease of the newly detected genetic variant, the MYBPC3 exon 21 was also sequenced in the other family members. Healthy Italian individuals free from any history of cardiac diseases (122 volunteer donors who provided informed written consent) were also analysed for the new variant to see if it represented a polymorphism. Sequencing reactions were performed using BigDye[®] Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Products were run on an ABI 3730 sequencer analyser (Applied Biosystems) and analysed by means of Seq Scape v.2.5 (Applied Biosystems).

Results

Mutation analysis showed the presence of known polymorphisms in few family members, such as MYBPC3 IVS4-12 (rs11570050), and MYBPC3 V158M (rs3729986) (Table 2). However, none of the screened mutations were found to be present.

By the subsequent sequencing analysis performed in the index patient, a missense genetic variant within MYBPC3 gene was identified: G13999T (Gln689His), reference sequence U91629 (Fig. 1, B, bottom panel). No mutation was detected in the other genes.

Presence of the Gln689His variant was also assessed in two of the brothers, the second one (51 yr-old) and the youngest one (35 yr-old), and also in two members from the last generation of the kindred (Table 2; Fig. 1, A, top panel).

The frequency of the variant in the general population was assessed through direct genetic screening of 122 healthy individuals from the general Italian population. All of them tested negative for the presence of this mutation.

Discussion

HCM families often show previously undescribed gene mutations. However, since the number of mutations is not infinite and high percentages of

cases are found to carry known gene variants, we first decided to screen our family for known mutations. Based on the negative results of the first approach, we sequenced the most suitable HCM genes in the index patient. Thus, we found a novel MYBPC3 gene mutation. The variant identified in the index patient was also detected in a younger brother who had recently developed IVS hypertrophy. Another brother carrying the same mutation had a moderate degree of eccentric hypertrophy and was also affected by mild arterial hypertension.

The genetic variant identified within MYBPC3 has not been previously described. It affects a highly conserved residue (the mutant G appears to be conserved in at least 21 eutherian mammals, from mice to humans). In particular, this variant changes the last amino acid of MYBPC3 exon 21, that could be involved in the RNA splicing process. In addition, the Gln689His mutation does not appear in public databases such as PubMed or Ensembl, and it has never been described as a polymorphism. The potential pathogenic role of this novel mutation is underlined by its absence in a sample of healthy subjects from the general Italian population.

PolyPhen-Polymorphism Phenotyping (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>), an automatic tool for predicting the possible impact of an amino acid substitution on the structure and function of a human protein, was applied to the Gln689His mutation. The prediction is based on straightforward empirical rules that are applied to the sequence, phylogenetic, and structural information characterizing the substitution. The Gln689His variant was predicted to be "possibly damaging."

This novel MYBPC3 mutation does not appear to induce an early form of the disease, since the signs of HCM became manifest between age 35 and 40 yr in both family members, without any adverse events so far recorded. In addition, two young family members from the last generation also carried the mutation, but they did not show any echocardiographic evidence of HCM, most probably due to their youth (19 and 26 yr, respectively). We cannot exclude the possibility that the late onset of HCM in this family may also be due to the absence of other genetic alterations.

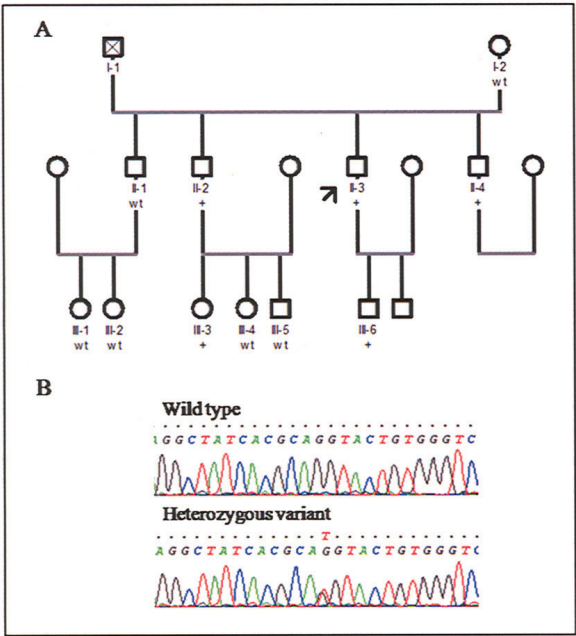


Fig. 1. (A, top panel): Genealogical tree of the study kindred. Symbols: squares = males; circles = females; + = carriers of the mutation; wt = wild type. The proband is indicated by an arrow. (B, bottom panel): Sequencing results showing the MYBPC3 gene variant.

Table 2. Clinical characteristics of the study subjects and relevant results of genetic screening for MYBPC3 gene variants.

Code	Sex	Age (yr)	HT	MYBPC3 G689H	MYBPC3 IVS4-12	MYBPC3 V158M	IVS (6-11 mm)	PW (6-11 mm)	RWT (<0.45)	LVMI (g.m ²)	Cardiac phenotype
I-1*	M	75									Unknown
I-2	F	81	-	GG	CC	GG	10	9	0.43	85	Concentric hypertrophy
II-1	M	56	+	GG	CC	GG	13	11	0.48	122	
III-1	F	29	-	GG	CC	GG	8	8	0.34	77	Concentric remodeling
III-2	F	27	-	GG	CC	G	7	7	0.29	67	
II-2	M	51	+	GT	CC	AG	12	9	0.46	94	
III-3	F	26	-	GT	CG	AG	9	9	0.39	84	
III-4	F	20	-	GG	CG	GG	7	7	0.29	61	HCM
III-5	M	18	-	GG	CC	GG	10	8	0.35	91	
II-3	M	48	-	GT	CG	AG	23	11	0.70	148	Concentric remodeling
III-6	M	19	-	GT	CG	AG	8	8	0.40	60	
II-4	M	35	-	GT	CG	AG	12	11	0.49	102	

*deceased. HT = hypertension

The lack of a stringent relationship between carrier status of the disease mutation and presence of cardiac hypertrophy in our family, as documented by the 51-yr-old brother of the proband, confirms previous evidence of great variability in phenotypic expression of cardiac hypertrophy in HCM. This phenomenon has been related to the existence of modifier genes that may contribute to the development of cardiac hypertrophy in the presence of the same causal mutation [8].

In conclusion, we describe the presence of a novel MYBPC3 gene mutation in a patient affected by HCM, and in other family members. In contrast, the mutation described in this family was absent in 244 reference alleles.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Italian Ministry of Health to MV and SR; by a grant from the Ingenious HyperCare European Program to MV, and by two grants from the Spanish Ministry of Health (EMER07/018 and PI06/0165) to MB.

References

1. Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, Benaiche A, Isnard R, Dubourg O, Burban M, Gueffet JP, Millaire A, Desnos M, Schwartz K, Hainque B, Komajda M. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* 2003;107:2227-2232.
2. Van Driest S, Ommen SR, Tajik AJ, Gersh BJ, Ackerman MJ. Sarcomeric genotyping in hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc* 2005;80:463-469.
3. Charron P, Dubourg O, Desnos M, Bennaceur M, Carrier L, Camproux AC, Isnard R, Hagege A, Langlard JM, Bonne G, Richard P, Hainque B, Bouhour JB, Schwartz K, Komajda M. Clinical features and prognostic implications of familial hypertrophic cardiomyopathy related to the cardiac myosin-binding protein C gene. *Circulation* 1998;97:2230-2236.
4. Van Driest SL, Vasile VC, Ommen SR, Will ML, Tajik AJ, Gersh BJ, Ackerman MJ. Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1903-1910.
5. Erdmann J, Raible J, Maki-Abadi J, Hummel M, Hammann J, Wollnik B, Frantz E, Fleck E, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Spectrum of clinical phenotypes and gene variants in cardiac myosin-binding protein C mutation carriers with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:322-330.
6. Ehlermann P, Weichenhan D, Zehelein J, Steen H, Pribe R, Zeller R, Lehrke S, Zugck C, Ivandic BT, Katus HA. Adverse events in families with hypertrophic or dilated cardiomyopathy and mutations in the MYBPC3 gene. *BMC Med Genet* 2008;9:95.
7. Jaaskelainen P, Kauusisto J, Miettinen R, Karkkainen P, Karkkainen S, Heikkinen S, Peltola P, Pihlajamäki J, Vauhkonen I, Laakso M. Mutations in the cardiac myosin-binding protein C gene are the predominant cause of familial hypertrophic cardiomyopathy in eastern Finland. *J Mol Med* 2002;80:412-422.
8. Daw EW, Chen SN, Czernuszewicz G, Lombardi R, Lu Y, Ma J, Roberts R, Shete S, Marian AJ. Genome-wide mapping of modifier chromosomal loci for human hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* 2007;16:2463-2471.
9. Brion M, Allegue C, Monserrat L, Hermida M, Castro-Beiras A, Carracedo A. Large scale analysis of HCM mutations in sudden cardiac death. *Forensic Sci Int (Genetics Supplement Series)* 2008;1:549-550.

3.2. Artículo 5: Genetic screening in Sudden Cardiac Death related cases.

Este estudio incluye 106 muestras de individuos adultos entre los que encontramos unos afectos de MCH o SQT1 y otros con síntomas cardíacos inexplicados, tales como síncope o muerte súbita recuperada y/o historia familiar de MSC. Las muestras fueron añadidas a la estrategia de detección de variantes adecuada a cada caso en particular en función de la historia clínica que se nos proporcionó. Así, un total de 53 muestras se analizaron en la estrategia de MCH; 62 muestras se analizaron para KCNQ1; 63 para KCNH2 y 66 para SCN5A. En aquellas muestras incluidas en el estudio de SQT1 en que no se detectó variante se llevó a cabo la secuenciación directa de KCNQ1 y KCNH2. Se detectaron un total de cinco variantes genéticas en la estrategia de detección de variantes en KCNQ1, KCNH2 y SCN5A (tres variantes en KCNH2 responsables de LQT2 y dos variantes en KCNQ1 responsables de LQT1).

En la estrategia de MCH se detectaron un total de tres variantes genéticas, dos de ellas detectadas en MYBPC3 y una tercera en MYH7. Todas ellas fueron confirmadas por secuenciación directa.

Genetic screening in sudden cardiac death related cases

Allegue C^{1,2}, Gil R^{1,3}, Blanco-Verea A^{1,2}, Santori M^{1,2}, Rodríguez-Calvo MS⁴,
Concheiro L⁴, Carracedo A^{1,3}, Brion M^{1,2}.

¹ Genomics Medicine Group, University of Santiago de Compostela, CIBERER Santiago de Compostela, Spain.

² Genetics of Cardiovascular and Ophthalmologic Diseases, Hospital-University Complex of Santiago (CHUS). Santiago de Compostela, Spain.

³ National Genotyping Center (CEGEN), University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.

⁴ Department of Pathology and Forensic Sciences. University of Santiago de Compostela. Spain.

Abstract

Genetic analysis in sudden cardiac death cases (SCD) helps not only to solve the problem of forensic pathology to determine the cause of death, but also helps preventing future deaths in families at risk.

Considering cardiomyopathy and channelopathy are major causes of sudden cardiac death), using new genotyping technologies, this study has analyzed a wide spectrum of known mutations in key genes associated with hypertrophic cardiomyopathy (HCM), long QT syndrome (LQTS) and Brugada syndrome (BrS), in cases of SCD in young adults and their relatives.

Introduction

Geneticists, forensic pathologists and medical doctors all of them share the necessity of finding the causes of the death in sudden death (SD) cases. The SD takes place suddenly and unexpectedly (5-10% of the natural deaths are unexplained after comprehensive medico-legal investigation [1]). SD occurs 1 h from the start of the symptoms and 24 of being seen alive and well when the death is not witnessed. In most cases the cause and manner of these sudden deaths can be established after autopsy because cardiac abnormalities can be found. This sudden death is then named Sudden Cardiac Death (SCD).

Sudden cardiac death is one of the most common causes of death in developed countries with an incidence of 30-200/100000 people each year, although the true incidence continues being a challenge because of the inconsistency of an exact definition for SCD. Coronary heart disease with different cardiomyopathies patterns is the most frequent cause of death in adult population[2, 3] whereas in people under 35 years old, other diseases have been associated, most of them have non ischemic nature[4] [5] Whoever, in case of young people, the cause of death cannot be explained neither after autopsy nor after laboratory tests in a large number of cases. The investigation of the causes of these unexpected deaths has become one of most important objective as it occurs in previously healthy young people in many cases.[6] Inherited heart diseases such as hypertrophic cardiomyopathy (HCM), arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) and primary electrical diseases such long QT syndrome (LQTS), Brugada syndrome (BrS) or catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT), are the main cause of death in young adults with no previous clinical history. Although many different programs are being developed in clinical practice in general population and also in athletes, this screening programs, which were created to prevent SCD, have been a source of debate, even more in case of athletes SCD prevention [7, 8]. Most often these inherited cardiac disorders give rise to lethal ventricular arrhythmias and show an autosomal dominant mode of inheritance, so the detection and preventing treatment in mutation carriers should be offered not only to patients but also to relatives with a family history of SCD. Early detection of disease and identifying risk factors for sudden death as it could be mutations with a worse prognosis could prevent recurrence of any fatal cardiac event in both, individuals diagnosed with one of these pathologies and their relatives

Many studies have evaluated clinicopathological factors together with genetic analysis in order to identify a high proportion of probable causes of the deaths and to evaluate potential risks factors[9] [10] [11] [12].

Genetic screening of the genes described as implicated in the different pathologies may help to evaluate the diagnosis and prognosis of the disease in each case. In table 1 is briefly summarised the genetic basis of HCM and familial LQTS, the two heart diseases which can lead to SCD studied in most detail to

date. Specific genetic tests would proportionate new data to add to the diagnosis of patients and relatives in order to decide an adequate pharmacological therapy or surgery.

Our main objective in this study is trying to understand the genetic causes hidden behind SCD cases and the genetic analysis of the relatives of SCD victims in order to detect asymptomatic causative mutation carriers if possible that can benefit not only from clinical but also from genetic counselling.

Methods

Inclusion criteria:

Samples were recruited from several Institutes of Legal Medicine along Spain in case of deceased cases where the cause of the death could not be explained after autopsy and laboratory tests. Clinical cases were referred to our cardiogenetic laboratory from general practitioners or medical cardiologists who contacted with us from several Spanish hospitals.

Our study included 106 individuals analysed, 69 of them index cases without relatives included in the study and the remaining 37 belonging to 12 families. Samples included in the study met at least one of the following conditions: 1) personal history of sudden cardiac death, including deceased individuals or individuals recovered after SCD event and 2) direct family history of sudden cardiac death. Figure 1 describes the total number on individuals analysed.

Samples considered in category 1 include 37 deceased individuals with structural anomalies detected in the autopsy and with structurally normal hearts. Ten cases showed previous cardiac symptoms, 13 of them did not show any symptom and there is no information available of the remaining cases. Autopsy report was available in 35 of the cases, including 9 negative autopsies and 26 with some pathological finding.

Twelve cases are individuals recovered after a sudden death event, 4 of them with previous cardiac symptoms and 8 of them with no warning signs.

Among the 12 families collected, in 6 of them the index case was not available and only first degree relatives with none pathological history were studied. In other 4 families the index case was again not available; however some of the

first degree relatives had pathological medical history, one case with HCM, two cases with LQTS and another case with syncope since childhood. Finally we consider other two families with the index case and some affected relatives.

Autopsy reports, family history review and clinical history were collected if available. Circumstances of the victim at the moment in which the cardiac arrest took place were assessed not only in sudden cardiac death cases but also in aborted cardiac death events.

Evaluation and diagnosis were developed by cardiologists and forensic scientist following the standard procedures in all cases. This study was developed according to the recommendations of the Declaration of Helsinki and approved by the local ethics committees of the participating institutions.

Genetic Screening

After appropriate counselling, genetic analysis was offered to participants, using DNA extracted from blood, frozen tissues or paraffin embedded material.

A mutation screening strategy was developed by means of mass spectrometry in Sequenom MassARRAY™ genotyping platform (Sequenom Inc.), which allowed us to carry out an extensive genetic screening in both SCD cases and also in relatives. Two different genetic approaches were performed HCM strategy and LQTS strategy (Table 1).

Described mutations on HCM genes were analysed by means of the Massarray genotyping System of Sequenom. The genotyping strategy used is an upgrade of the one described by Brion et al [13], which currently includes 680 genetic variant in 16 genes associated with HCM. All the mutations detected with the genotyping platform were subsequently sequenced using BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and a 3730xl DNA analyser (Applied Biosystems).

Long QT syndrome approach, described by Allegue et al (2010) was used for studying mutations on KCNQ1, KCNH2 and SCN5A genes. Additionally, exons and flanking intronic regions of KCNQ1 and KCNH2 genes (GeneBank: AF000571 and U04270 respectively) were analyzed by direct sequencing by using BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and

a 3730xl DNA analyser in those samples in which no positive genetic variation was detected with the Sequenom MassARRAY® System .

After an exhaustive revision of the clinical history, autopsy results and/or family history, each sample was added to the most suitable screening strategy.

Results

We found out that most SCD index cases were males (71%), in most of them there is no information available about the circumstances of death, 9 of the cases occurred while sleeping or resting, and 15 of which occurred while performing some activity, either working, driving or during or after playing sports. Table 2 summarise the SCD index cases characteristics.

Most of the families showed primary electrical disease (73%), most of them familiar Long QT syndrome. As it can be shown in figure 1, among the 37 deceased individuals 22 of them showed some structural findings in the heart at autopsy and 14 cases presented an structurally normal heart; while most of recovered SCD cases did not showed any pathological antecedent except four cases with LQTS.

We present the results obtained from both genetic screening strategies, HCM and LQTS. Among the cases with none family members included in the study, five individuals showed a genetic variant with a possible photogenic effect, three in the LQTS genes and two in the HCM genes. Among the 12 families analysed, genetic variant was found in three of them.

Table 3 includes the genetic variant with possible pathogenic effect detected in the samples recruited in this study. Five genetic variants were detected in the genes responsible of arrhythmogenic diseases, three in KCNH2 responsible of LQT type 2 and two in KCNQ1 responsible of LQT type 1. Three genetic variants were present in the most frequently mutated genes in HCM, MYBPC3 and MYH7, with two and one mutation respectively.

Genetic variants detected in the LQT type 1 gene, are two missense mutations G325R and R366W, widely described in the literature ([14], [15], [16], [17] and [18], [19], [20], [21], respectively). G325R was found in a 19 years old man who died suddenly and had personal and familiar history of SQTL. R366W variant

was found in a family where the index SCD case was not available, but we performed the analysis in 9 first degree relatives, 4 of them LQTS affected.

Among tree genetic variants found in the LQT2 gene, two of them were previously described, H562R and P1093L. H562R mutation [22] was found in a male with a history of syncope at rest and a remarkably long QT leading to the diagnosis at age 20. His grandfather, who had recurrent syncope and was recovered from a sudden death at age 71 was also included in the study and was found to be carrier of the mutation detected P1093L ([22], [23]) was found in a young male with a history of deafness and syncope family. The C566G variant was found in an asymptomatic Long QT syndrome affected woman, with a sister also affected by LQTS with syncope history, and whose father died at age 30 in the bed because of an unknown cause. It has not been found any information about this mutation published in the literature or in any of the databases available online, but it has been described a mutation in the same aminoacidic position [24] resulting in a change of cysteine by serine, instead of cysteine by glycine as in the present case. The latest mutation in the gene KCNH2 was P1093L [22], [23] found in a young male with a family history of deafness and syncope.

Genetic screening in HCM genes has reported three genetic variants. The M982T mutation in the MYH7 gene has been associated in the literature with increased left ventricular wall thickness and familiar history of SCD [25]; in the present study the mutation was detected in a 22 years old man died suddenly, with none personal or family history, in which the autopsy report found only a slight dilatation of the cavities. The widely described K814del in the MYBPC3 gene [26], [27],[28] was found in a 23 years old man who died suddenly while playing football. His medical history showed no associated medical record, but the autopsy report was coincident with HCM. Finally, the P910T variant, also in the MYBPC3 gene, was found in a 33 years old man subjected to beta blocker therapy because of suffering syncopal episodes since childhood with a family history of two brothers who died suddenly at the age of 8 and 14 years. However, when parents without any personal medical record were included in the study, also found that the mother was a carrier of this variant. This change, P910T has been reported twice in HCM patients with additional mutations, so its implication as a disease causal mutation remain unknown ([29], [30]).

Discussion

It has been described nearly half of young SCD victims from 1 to 35 years of age, there are no obvious warning signs and sudden death often occurs as a first symptom without notice [31]. With recent advances in molecular biology, it has become apparent that a proportion of these deaths are due to mutations in genes leading to inherited cardiac diseases that may lead to sudden cardiac death [32].

Clinical and autopsy reports are useful to guide the genetic screening in each SCD case and/or in relatives. Many studies had highly demonstrated that genetic and clinical screening of SCD first and second degree case relatives, even in asymptomatic ones, are useful in preventive treatment and diagnosis or prognosis [9, 10, 12, 33].

Genetic screening allowed us to unmask the underlying genetic variation implicated in the inherited disease possible responsible of the sudden death event in 4 of the 49 SCD cases considered. Unfortunately family member were not available to perform genetic screening in three of the cases and only in one of them, a relative also affected by LQTS was included in the examination resulting also to be a carrier of the mutation.

Five additional mutations were found in people with direct family history of sudden cardiac death, but not themselves. It is worth mentioning that among these individuals approximately 53% had some personal cardiac medical history and among these about 27% were carriers of a mutation, all of them in the ion channel cardiac genes (Figure 1).

Previous studies such as Tan et al 2005 [10] described the importance of cardiological and genetic examination in surviving first and second degree relatives to increase the likelihood of establishing familiar diagnosis, specially in families in which at least 2 SCD cases took place at age <40 years old. Behr et al [12] described that first degree syncope was the only significant predictor they found useful for diagnosis.

Gimeno et al [34] found statistical association between male sex and sudden death and exercise related sudden death was associated with young age. They also described greater association between sudden deaths during exercise-stress-normal daily activities in cardiomyopathy than channelopathy. In our

study the proportion of men who suffered SCD events was higher than in women.

Genetic screening increased the diagnostic yield in many cases in which clinical proofs or autopsy were not conclusive and also help us to detect presymptomatic relatives who are carriers of the genetic variation detected.

SCD remains being a major health problem despite the progress made in the mechanisms, risk factors and clinical and pharmacological management

Christiaans et al [35] carried out an in-depth literature review of the clinical risk markers in hypertrophic cardiomyopathy. Literature, as recommended international guidelines, supports the use of six major risk factors: previous cardiac arrest or sustained ventricular tachycardia, non-sustained ventricular tachycardia, extreme left ventricular hypertrophy, unexplained syncope, abnormal blood pressure response and family history of sudden death to establish risk stratification of SCD. They propose the addition of left ventricular outflow tract obstruction as it seemed to be associated to a higher risk of SCD.

Data presented here shows as we get more precisely of diagnose each of the hereditary diseases in the clinic and get precisely the sort of cases of sudden cardiac death, ruling out possible causes, such as myocarditis or congenital anomalies among others, genetic screening in in young adults died suddenly and their relatives, is becoming an increasingly feasible study. In addition, the progressive technological development we are experiencing at the present time, seems to indicate that the available genotyping strategies will help in the near future more extensive studies and lower costs [36].

Our genetic screening provides a fast genetic variant detection which contribute to the SCD risk stratification in each case and helps to establish a diagnosis or prognosis and consequently to decide the most suitable pharmacological or surgery treatment in patients and/or genetic variation carriers relatives. Asymptomatic patients who carry a genetic variation can benefit from a frequent clinical monitoring.

Acknowledgments

We greatly appreciate the collaboration of all persons who have kindly agreed to donate a DNA sample for this study and all institutions involved in collecting samples: CHOU from Ourense, CHUS from Santiago de Compostela, CHUVI from Vigo, Hospital Comarcal from Monforte, Hospital de la Ribera from Valencia (Dr. Ángel Zúñiga), Hospital General Universitario from Alicante, Hospital Reina Sofía from Tudela, Hospital San Pedro de Alcántara from Cáceres, Hospital Virgen de la Arrixaca from Murcia (Dr. Juan Ramón Gimeno), IMELGA and University IML both from Santiago de Compostela, IML and INT from Sevilla (Dr. Joaquín Lucena) and IML from Valencia (Dr. Pilar Molina and Dr. Rafael Bañón).

This work was supported by two grants from the Spanish Ministry of Health (EMERO7/018 and PIO6/0165) to MB.

REFERENCES

1. Cohle SD, Sampson BA: The negative autopsy: sudden cardiac death or other? *Cardiovasc Pathol* 2001; 10(5): 219-22.
2. Virmani R, Burke AP, Farb A: Sudden cardiac death. *Cardiovasc Pathol* 2001; 10(5): 211-8.
3. Davies MJ, Thomas A: Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *N Engl J Med* 1984; 310(18): 1137-40.
4. Drory Y, Turetz Y, Hiss Y, et al.: Sudden unexpected death in persons less than 40 years of age. *Am J Cardiol* 1991; 68(13): 1388-92.
5. Basso C, Calabrese F, Corrado D, Thiene G: Postmortem diagnosis in sudden cardiac death victims: macroscopic, microscopic and molecular findings. *Cardiovasc Res* 2001; 50(2): 290-300.
6. Chugh SS, Kelly KL, Titus JL: Sudden cardiac death with apparently normal heart. *Circulation* 2000; 102(6): 649-54.
7. Viskin S: Antagonist: routine screening of all athletes prior to participation in competitive sports should be mandatory to prevent sudden cardiac death. *Heart Rhythm* 2007; 4(4): 525-8.
8. Corrado D, Thiene G: Protagonist: routine screening of all athletes prior to participation in competitive sports should be mandatory to prevent sudden cardiac death. *Heart Rhythm* 2007; 4(4): 520-4.
9. Hofman N, Tan HL, Clur SA, et al.: Contribution of inherited heart disease to sudden cardiac death in childhood. *Pediatrics* 2007; 120(4): e967-73.
10. Tan HL, Hofman N, van Langen IM, van der Wal AC, Wilde AA: Sudden unexplained death: heritability and diagnostic yield of cardiological and genetic examination in surviving relatives. *Circulation* 2005; 112(2): 207-13.
11. Behr E, Wood DA, Wright M, et al.: Cardiological assessment of first-degree relatives in sudden arrhythmic death syndrome. *Lancet* 2003; 362(9394): 1457-9.
12. Behr ER, Dalageorgou C, Christiansen M, et al.: Sudden arrhythmic death syndrome: familial evaluation identifies inheritable heart disease in the majority of families. *Eur Heart J* 2008; 29(13): 1670-80.
13. Brion M, Allegue C, Monserrat L, et al.: Large scale analysis of HCM mutations in sudden cardiac death. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2008; 1: 549-550.
14. Tanaka T, Nagai R, Tomoike H, et al.: Four novel KVLQT1 and four novel HERG mutations in familial long-QT syndrome. *Circulation* 1997; 95(3): 565-7.
15. Donger C, Denjoy I, Berthet M, et al.: KVLQT1 C-terminal missense mutation causes a forme fruste long-QT syndrome. *Circulation* 1997; 96(9): 2778-81.
16. Splawski I, Shen J, Timothy KW, et al.: Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 2000; 102(10): 1178-85.
17. Lupoglazoff JM, Denjoy I, Villain E, et al.: Long QT syndrome in neonates: conduction disorders associated with HERG mutations and sinus bradycardia with KCNQ1 mutations. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43(5): 826-30.

18. Splawski I, Shen J, Timothy KW, et al.: Genomic structure of three long QT syndrome genes: KVLQT1, HERG, and KCNE1. *Genomics* 1998; 51(1): 86-97.
19. Larsen LA, Christiansen M, Vuust J, Andersen PS: High-throughput single-strand conformation polymorphism analysis by automated capillary electrophoresis: robust multiplex analysis and pattern-based identification of allelic variants. *Hum Mutat* 1999; 13(4): 318-27.
20. Choi G, Kopplin LJ, Tester DJ, et al.: Spectrum and frequency of cardiac channel defects in swimming-triggered arrhythmia syndromes. *Circulation* 2004; 110(15): 2119-24.
21. Struijk JJ, Kanters JK, Andersen MP, et al.: Classification of the long-QT syndrome based on discriminant analysis of T-wave morphology. *Med Biol Eng Comput* 2006; 44(7): 543-9.
22. Kapplinger JD, Tester DJ, Salisbury BA, et al.: Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION long QT syndrome genetic test. *Heart Rhythm* 2009; 6(9): 1297-303.
23. Kapa S, Tester DJ, Salisbury BA, et al.: Genetic testing for long-QT syndrome: distinguishing pathogenic mutations from benign variants. *Circulation* 2009; 120(18): 1752-60.
24. Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ, et al.: Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA* 2005; 294(23): 2975-80.
25. Morita H, Larson MG, Barr SC, et al.: Single-gene mutations and increased left ventricular wall thickness in the community: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2006; 113(23): 2697-705.
26. Van Driest SL, Vasile VC, Ommen SR, et al.: Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44(9): 1903-10.
27. Song L, Zou Y, Wang J, et al.: Mutations profile in Chinese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Chim Acta* 2005; 351(1-2): 209-16.
28. Cardim N, Perrot A, Santos S, et al.: Hypertrophic cardiomyopathy in a Portuguese population: mutations in the myosin-binding protein C gene. *Rev Port Cardiol* 2005; 24(12): 1463-76.
29. Olivetto I, Girolami F, Ackerman MJ, et al.: Myofilament protein gene mutation screening and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc* 2008; 83(6): 630-8.
30. Hershberger RE, Norton N, Morales A, et al.: Coding Sequence Rare Variants Identified in MYBPC3, MYH6, TPM1, TNNC1 and TNNI3 from 312 Patients with Familial or Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* 2010.
31. Oliva A, Brugada R, D'Aloja E, et al.: State of the Art in Forensic Investigation of Sudden Cardiac Death. *Am J Forensic Med Pathol* 2010.
32. Rodriguez-Calvo MS, Brion M, Allegue C, Concheiro L, Carracedo A: Molecular genetics of sudden cardiac death. *Forensic Sci Int* 2008; 182(1-3): 1-12.
33. Gimeno JR, Lacunza J, Garcia-Alberola A, et al.: Penetrance and risk profile in inherited cardiac diseases studied in a dedicated screening clinic. *Am J Cardiol* 2009; 104(3): 406-10.
34. Gimeno JR, Oliva MJ, Lacunza J, et al.: Characteristics of sudden death in inherited heart disease. *Rev Esp Cardiol* 2010; 63(3): 268-76.

35. Christiaans I, van Engelen K, van Langen IM, et al.: Risk stratification for sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy: systematic review of clinical risk markers. *Europace* 2010; 12(3): 313-21.
36. Brion M, Quintela I, Sobrino B, et al.: New technologies in the genetic approach to sudden cardiac death in the young. *Forensic Sci Int* 2010.

Figure 1. Flow diagram describing the probands and relatives included in the study, their autopsy findings or clinical diagnosis and the successful genetic testing.

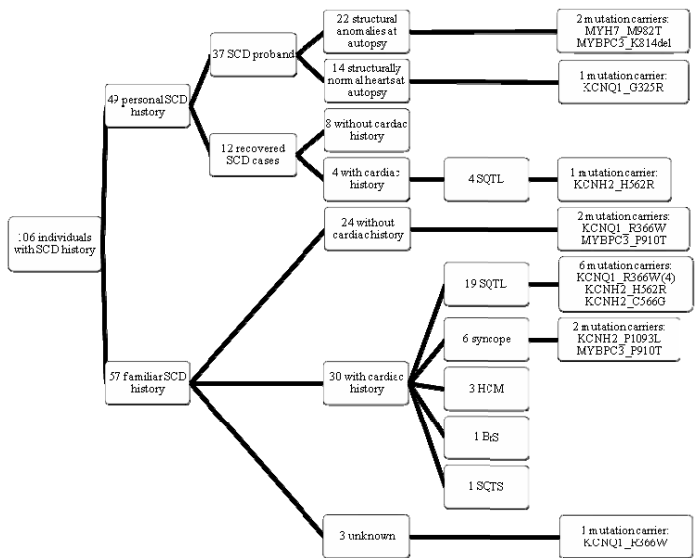


Table 1. Main genetic causes of HCM and LQTS

Disease	Gene Name	Encoded Protein	% of disease	Included in the study
HCM	MYH7	β-Myosin heavy chain	~25%	YES
HCM	MYBPC3	Myosin binding protein C	~25%	YES
HCM	TNNI3	Troponin I type 3	~3-5%	YES
HCM	TNNT2	Troponin T type 2	~3-5%	YES
HCM	TPM1	α-tropomyosin	~1%	YES
HCM	TNNC1	Troponin C type 1	Rare	YES
HCM	ACTC	α-actin	Rare	YES
HCM	MYH6	α-Myosin heavy chain	Rare	YES
HCM	MYL2	Myosin light chain 2	Rare	YES
HCM	MYL3	Myosin light chain 1	Rare	YES
HCM	ACTN2	α-actinin	-	NO
HCM	CSRP3	cardiac LIM protein	-	NO
HCM	MYOZ2	Myozenin 2	Rare	NO
HCM	TCAP	Titin-cap (telethonin)	Rare	YES
HCM	VCL	Vinculin	-	NO
HCM	PLN	Phospholamban	Rare	NO
HCM	FXN	Frxatin	-	NO
HCM	GLA	α-galactosidase	-	YES

Disease	Gene Name	Encoded Protein	% of disease	Included in the study
HCM	LAMP2	Lysosomal-associated membrane protein 2	-	NO
HCM	PRKAG2	Protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit	-	YES
HCM	TTN	Titin	Rare	YES
HCM	MYLK2	Myosin light chain kinase 2	-	YES
HCM	MYO6	Myosin VI	-	YES
LQTS	KCNQ1	Potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1	30-35%	YES
LQTS	KCNH2	Potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2	25-30%	YES
LQTS	SCN5A	Sodium channel, voltage-gated, type V, alpha subunit	5-10%	YES
BrS			20-30%	
LQTS	ANK2	Ankyrin 2	Rare (<1)	NO
LQTS	KCNE1	Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 1	Rare (<1)	NO
LQTS	KCNE2	Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 2	Rare (<1)	NO
LQTS	KCNJ2	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2	Rare (<1)	NO

Disease	Gene Name	Encoded Protein	% of disease	Included in the study
LQTS	CACNA1C	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	Rare (<1)	NO
LQTS	CAV3	Caveolin 3	Rare (<1)	NO
LQTS	SCN4B	Sodium channel, voltage-gated, type IV, beta	Rare (<0,1)	NO
LQTS	AKAP9	A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9	Rare (<0,1)	NO
LQTS	SNTA1	syntrophin, alpha 1	Rare (<0,1)	NO

Table 2. SCD index cases characteristics.

Total SCD cases	49
- Autopsy cases	37 (75.5%)
- Aborted cases	12 (24.5%)
Males	35 (71.4%)
Mode of death:	
- At rest	9 (18.4%)
- On exertion	15 (30.6%)
- Unknown/others	25 (51.0%)
Antecedent symptoms:	
- Present	15 (30.6%)
- Absent	21 (42.9%)
- Unknown	13 (26.5%)

Table 3. Genetic variants detected.

genetic variant	Gene	Sex	Age	SCD	Autopsy findings	Family medical history	relatives (mutation carriers)
G325R	KCNQ1	M	19	Yes	structurally normal heart	Familial LQTS	no
R366W	KCNQ1	F		No		Familial LQTS, SCD in a daughter	8 (5)
H562R	KCNH2	M	20	No		LQT with syncope at rest	1 (1)
C566G	KCNH2	F		No		Familial LQTS, SCD in the father	no
P1093L	KCNH2	M		No		Familial deafness, syncope	no
M982T	MYH7	M	22	Yes	Hypertrophic heart	None	no
K814del	MYBPC3	M	23	Yes	Hypertrophic heart	None	no
P910T	MYBPC3	M	33	no		SCD in two brothers (8 and 14 years). Syncopal episodes since childhood, beta-blocker treatment	2 (1)

3.3. Artículo 6: Sarcomeric gene mutations in sudden infant death syndrome (SIDS).

En el individuo adulto, la MSC puede tener lugar sin que haya una manifestación fenotípica que pueda ser detectada incluso tras un riguroso examen post mórtem. Estudios genéticos han identificado mutaciones en genes que codifican proteínas de la sarcómera que producen modificaciones en la proteína capaces de provocar un daño fatal, sin que haya un efecto fenotípico detectable en pruebas clínicas habituales, en autopsia o incluso en cortes histológicos (desorganización de las fibras cardíacas leve o inexistente). A la vista de estos datos, nos planteamos la posibilidad de que los genes implicados en el desarrollo de la MCH en el adulto pudiesen tener relación con el desarrollo del SMSL en los que la causa de la muerte no puede ser identificada. Así, estudiamos 344 casos en los que el informe de autopsia concluye que se trata de individuos fallecidos por SMSL. Se analizaron 680 variantes genéticas en la estrategia de detección diseñada que desarrollamos en la plataforma de genotipado de alto rendimiento. Se detectaron un total de 13 variantes genéticas previamente descritas con un posible efecto patogénico en 16 de las muestras estudiadas y tres polimorfismos genéticos. Se detectó además una variante *de novo* que, al igual que el resto de la variantes detectadas, se confirmó por secuenciación directa.

Este estudio señala la posible implicación de la MCH en los casos de muerte súbita del lactante y, por tanto, resalta la necesidad de la aplicación del estudio genético de genes sarcoméricos y genes implicados en el desarrollo de la MSC en el adulto en los casos de SMSL.

***Sarcomeric gene mutations in sudden infant death syndrome
(SIDS)***

Brion M^{1,2}, Allegue C^{1,2}, Santori M^{1,2}, Gil R³, Haas C⁴, Bartsch C⁴, Poster S⁵,
Madea B⁵, Brugada R⁶, Carracedo A^{2,3}

¹ Genetics of Cardiovascular and Ophthalmologic Diseases, Hospital-University Complex of Santiago (CHUS). Santiago de Compostela, Spain.

² Genomics Medicine Group, University of Santiago de Compostela, CIBERER Santiago de Compostela, Spain.

³ National Genotyping Center (CEGEN), University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.

⁴ Institute of Legal Medicine, Switzerland.

⁵ Institute of Forensic Medicine, University of Bonn, Bonn, Germany.

⁶ Cardiovascular Genetics Center, UdG-IdIBGi, University of Girona, Girona, Spain.

Abstract

In developed countries, sudden infant death represents the most prevalent cause of death in children between one month and one year on life. Epidemiological studies have described several environmental factors related with the syndrome as lay in their side or face-down or tobacco exposure; however all of them agreed that deaths result from the complex interaction of inherited endogenous characters and exogenous factors.

Until now, most of the genetic studies of this infant syndrome have established the premise of a different genetic background to the sudden cardiac death in the adult. Based on the absence of heart morphologically structural changes in the SIDS autopsies, the first search of genetic factors have been focused in arrhythmogenic disease.

In this work, due to the prompt death of the infants and due to the lack of time of developing a consequent hypertrophy, we have asked about the possibility of SIDS cases been carriers of HCM mutations responsible for sudden cardiac death in the adult. In order to through some light on this question we have studied 344 SIDS cases for the most common genes implicated in HCM in adults.

Introduction

In agreement with the internationally controversial and worldwide recognised definition of the sudden infant death syndrome (SIDS) - Definition of San Diego [1], the syndrome affects only children under one year of age who died suddenly and unexpectedly, in which the start of the fatal event is associated with sleeping and after a thorough investigation of the case, including the autopsy and medical history, no explanation of the death can be found.

Despite the reduction in the number of infant deaths in recent years, SIDS remains the leading cause of death in children between one month and one year of age. Japan and the Netherlands have the highest rates with 0.09 and 0.1 cases every 1000 births, respectively. US shows intermediate values with 0.57 cases/1000 births, while in Spain and UK the estimated rates are a bit smaller, 0.5 and 0.41 cases/1000 births, respectively.

For the lifetime of children, the incidence of sudden infant death is more limited in the early months of life, increases from second to fourth month and then descends again, so that 90% of cases occur in the first 6 months of life. In epidemiological terms, gender differences have been found, with a higher incidence in males than in females (60:40 ratio), as well as comparative ethnic differences have been observed [2].

The aetiology of sudden infant death is still unknown; several theories have been proposed along the time among which we can highlight the cardiovascular dysfunctions, as viral myocarditis or conduction system defects, but so far it is not known how much the genetic background and how much the environmental factors influence.

Genetic studies until now, have been basically focused in candidate genes search of 5 major categories [3]: Ion channels genes [4] [5] [6] [7] Serotonin neurotransmitter transporter gene (5-HTT) [8]; genes related to the early embryology of the autonomic nervous system [9]; nicotine metabolizing enzyme genes [10]; and inflammation regulatory, energy production genes, hypoglycemia and thermoregulator genes [11] [12], [13].

Although cardiomyopathies are the most important cause of sudden cardiac death in adults older than 35 years [14], very few cases of SIDS were studied

for these pathologies. Therefore, bearing this in mind, our idea was to study the most prevalent genes in HCM, in SIDS cases, with the main goal of answering the question of how many cases of sudden infant death can be explained by means of mutations detected in HCM genes, despite finding structurally normal hearts after autopsy

Material and Methods

Autopsy criteria

All autopsies were performed in compliance with the COE standards strictly following the standard procedure for sudden infant death cases, which are in agreement with the “European guidelines for medico-legal autopsies” [15] the “International standardised autopsy protocol” (ISAP; [16]) of the “Global strategy Task force of SIDS International”.

Autopsies were performed in the Institute of Legal Medicine of Zurich (Switzerland) and the Institute of Forensic Medicine of the University of Bonn (Germany). A total of 344 cases were recruited after a thorough external and internal examination, including X-rays investigation and histological, toxicological and microbiologic studies.

The study protocol was reviewed and approved by the regional ethical committee, to conform the principles outlined in the Declaration of Helsinki for human study (1997). Informed consents were obtained from the closest relatives of all subjects included in the study.

Molecular analysis

DNA was extracted from paraffin embedded cardiac tissue samples from the myocardium, the liver, the spleen, the thymus and the pancreas following a house made protocol, using phenol/chloroform.

For analysing HCM mutations we have developed a rapid and efficient mutation detection system based on semiautomated MALDI-TOF mass spectrometry using the Sequenom MassARRAY® System and the iPLEX Gold genotyping chemistry (Sequenom, Inc.). In the Iplex assay the DNA is previously amplified in multiplex reactions up to 40-plex level and the discrimination reaction is based in a MassEXTEND primer extension. This SBE reaction is based upon the annealing of a MassEXTEND primer adjacent to the mutation, which will be extended through the polymorphic site, generating allele-specific primer extension products that are 1 base longer. The extended products are dispensed over the spectrophotometer chip, and transferred to the spectrophotometer, where the resultant mass of the primer extension product is then analyzed through the application of MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry), and used to determine the sequence of the nucleotides at the polymorphic site.

In our strategy 44 multiplex reactions were designed with the MassARRAY assay design 3.1 software for analysing 688 genetic variants (eight genetic variants are duplicated) located in 16 genes (Table 1). Mutations were selected from the available databases or from the literature.

All positive mutations were confirmed by sequencing using a BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 kit (Applied Biosystems). Detection was performed in a 3730xl DNA analyser (Applied Biosystems) and analysed by means of SeqScape v2.5 (Applied Biosystems).

Results and Discussion

According to the San Diego recommendations [1], 286 of the 344 cases (83%) were classified as SIDS of category I and II, so no pathological findings appear at the autopsy or they are not sufficient to cause death (e.g. infections of the respiratory system). The remaining 58 cases were classified as not classified infant deaths, deceased children under 1year of age with probably defined causes of death.

DNA extraction and molecular analysis from paraffin embedded tissues is always a problem in terms of effectiveness and reproducibility of results, since most of the times they have been subjected to degradation by passing a preliminary alcohol fixation for undefined time. Even so, the results obtained in this study are quite satisfactory, with a genotyping call rate of 86.97%. Among the 344 samples analysed only three of them showed genotypes for less than 50% of the genetic variants and 55 for less than 80% of them. Among the 688 genetic variants analysed 9 of them did not produce any result.

Forteen subjects showed mutated alleles at 12 of the genetic variants analysed in the genotyping platform (Table 2), two of the genetic variants were present in two samples. Direct sequencing performed to check the possible mutations found with the MassArray system allowed to detect one additional novel genetic variant. Interestingly the most frequently mutated gene has been the MYBPC3, where nine genetic variants were found, one of which has appeared in two of the cases studied.

To hypothesize about the possible functional impact of missense variants, *in silico* predictions were performed using PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>). In table 2 classifications according to the scores obtained are shown.

To support the hypothesis of the involvement of mutations associated with HCM in SIDS deaths, a list of references found in the literature related to the observations described in this study is presented below. Notably, to date, there are no published results for the involvement of any of these mutations in SIDS.

MYBPC3 genetic variants

E1179K variant was found in a 4 weeks old female found death at bed with a subepicardial, subpleural and thymus petechiae, with a macroscopically normal heart and with no pre-existing diseases. This genetic variant was previously described in a family with 2 HCM diagnosed mutation carriers and two healthy mutation carriers at the age of 29 and 32 [17]. Therefore, the pathogenicity of this mutation remains uncertain pending of further findings such as new affected mutation carriers and absence in unrelated healthy controls, or subsequent functional studies.

The S217G variant was found in two unrelated cases, the first one is a 5 month old male found dead sleeping on the back, and diagnosed of an upper respiratory tract infection some days ago, whose autopsy findings showed some mucus in the middle ear, bronchitis, subpleural petechiae and a heart microscopically normal. The second did not show pathological findings at all. This variant, has been described with another missense mutation R453C in the MYH7 gene, in a cardiomyopathy diagnosed girl who experienced a cardiac arrest at the age 19 years [18]. The MYH7 variant was inherited from her effected father and the S217G variant from her phenotypically normal mother.

Variant A833T found in a case of SIDS category II, was previously classified as variant of uncertain effect (Cardiogenomics), because on one hand, although Morner et al. [19] found the variant in affected cases of HCM they also found the mutated allele in one of 100 healthy controls on the other hand, although other authors have ruled out their presence in healthy controls, the variant has been described in patients with HCM but always in combination with another mutation in this same gene or Troponin T gene [20] [21].

The change P910T has been reported twice in patients with other additional mutation, in one case with the E258K mutation also in the MYBPC3 gene ([22] and another case with variant D145E TNNC1 previously reported in a male index case with a family history of HCM [23].

Olivotto et al [22] also described the D610H variant in one HCM patient among 203 studied, but they do not specify any clinical or phenotypic data associated.

I1131T was previously described [21] [20] [24] , however, its pathogenicity remains uncertain because its presence was described in patients with another causal mutation detected.

Richard et al [25] describe the A1194T genetic variant in one patient of his cohort (197 cases in total between familial and sporadic HCM cases) and they excluded its presence in 200 control subjects.

The missense E907K mutation at MYBPC3 was considered novel, since it was neither found in the large MYBPC3 mutation list of the "Cardiogenomics" database (<http://genetics.med.harvard.edu>), nor in the SNP database dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) nor in the literature. Their causal role on the SIDS or in cardiomyopathies was underscored by its absence in 100 control individuals with normal cardiac function.

In addition to these putative damaging genetic variants reported in MYBPC3 gene, seven subjects showed the V896M polymorphic variant (rs35078470) and one case the R326Q variant (rs34580776) considered as a polymorphism in de dbSNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) and classified with uncertain effect in the published studies [26] [27] [28] [29].

MYH6 genetic variants

A 3 months old male found death in his bed, with a microscopically normal heart and a purulent infection of the middle ear found in the autopsy, presented the A1004S variant at MYH6 gene. The variant was described by Carniel et al. [30] in a MCD diagnosed case resulting in heart failure at 59 year old. They also excluded its presence in at least 300 normal population controls. Recently, Hershberger et al. [23] reported this variation in three individuals, one with idiopathic DCM and two with familial DCM. They propose this mutation as a probable cause of DCM

TNNT2 genetic variants

Morita et al [31] in their genetic study related to increased Left Ventricular Wall Thickness, reported the A28V variant at TNNT2 as a putative associated genetic variant, however among all the variants detected by the authors as

potentially causing increased LVWT the A28V was the only do not altering residues highly conserved during the course of evolution.

Four additional subjects showed the K253R genetic variant (rs3730238) at TNNT2 gene, previously considered as a polymorphism by several authors [32] [19]

TNNI3 genetic variants

A 7 months old male found dead with his face under a blanket, with some subepicardial haemorrhages, thymus petechiae and unremarkable heart conditions, was found to show the S166F variant at TNNI3 gene (Figure 1). This variant has been previously described as a HCM-causing mutation [33] [34].

MYL2 genetic variants

The A13T variant detected in the gene encoding the myosin regulatory light chain was described to have a rare cardiac phenotype that involved massive hypertrophy of the cardiac papillary muscles and adjacent ventricular tissue causing a mid-cavity obstruction [35], and it was also associated with familial hypertrophic cardiomyopathy [36].

GLA genetic variants

A boy and a girl died suddenly presented D313Y variant in the alpha galactosidase gene associated to Fabry disease, which is a rare X-linked lysosomal storage disorder associated with increased risk of stroke in young adults [37]. In screenings of Fabry disease among patients with idiopathic left ventricular hypertrophy, mutation D313Y was regarded as either pathogenic [38] [31] or non pathogenic [39], and recently Baptista et al [40] found the mutation in 5 affected patients with ischemic stroke and excluded its presence in 400 X chromosomes of healthy control subject.

Final remarks

Sudden death is a devastating complication of a number of cardiovascular diseases. In the young, sudden death is frequently caused by an underlying genetic heart disorder.

Research into understanding the genetic basis of sudden cardiac death, investigating the molecular mechanisms that lead from the gene defect to the clinical phenotype and elucidating the specific molecular and environmental triggers for sudden cardiac death will most likely lead to improvements in the management and prevention of sudden cardiac death in the young [41].

There is no doubt, that genetic cardiomyopathies play an important role in sudden cardiac deaths [42, 43], however, in infants because histopathological findings are essential to find out cases, up to now the frequency of HCM misdiagnosed as sudden infant death syndrome remains unknown. This study tried to unmask some of these cases and propose the HCM as one of the fundamental causes of sudden cardiac death also in children under 1 year of age.

Acknowledgments

This work was supported by two grants from the Spanish Ministry of Health (EMER07/018 and PI06/0165) to MB.

REFERENCES

1. Krous HF, Beckwith JB, Byard RW, et al.: Sudden infant death syndrome and unclassified sudden infant deaths: a definitional and diagnostic approach. *Pediatrics* 2004; 114(1): 234-8.
2. Moon RY, Horne RS, Hauck FR: Sudden infant death syndrome. *Lancet* 2007; 370(9598): 1578-87.
3. Weese-Mayer DE, Ackerman MJ, Marazita ML, Berry-Kravis EM: Sudden Infant Death Syndrome: review of implicated genetic factors. *Am J Med Genet A* 2007; 143A(8): 771-88.
4. Ackerman MJ, Siu BL, Sturner WQ, et al.: Postmortem molecular analysis of SCN5A defects in sudden infant death syndrome. *JAMA* 2001; 286(18): 2264-9.
5. Tester DJ, Ackerman MJ: Sudden infant death syndrome: how significant are the cardiac channelopathies? *Cardiovasc Res* 2005; 67(3): 388-96.
6. Arnestad M, Crotti L, Rognum TO, et al.: Prevalence of long-QT syndrome gene variants in sudden infant death syndrome. *Circulation* 2007; 115(3): 361-7.
7. Cronk LB, Ye B, Kaku T, et al.: Novel mechanism for sudden infant death syndrome: persistent late sodium current secondary to mutations in caveolin-3. *Heart Rhythm* 2007; 4(2): 161-6.
8. Weese-Mayer DE, Zhou L, Berry-Kravis EM, et al.: Association of the serotonin transporter gene with sudden infant death syndrome: a haplotype analysis. *Am J Med Genet A* 2003; 122A(3): 238-45.
9. Weese-Mayer DE, Berry-Kravis EM, Zhou L, et al.: Sudden infant death syndrome: case-control frequency differences at genes pertinent to early autonomic nervous system embryologic development. *Pediatr Res* 2004; 56(3): 391-5.
10. Rand CM, Weese-Mayer DE, Maher BS, et al.: Nicotine metabolizing genes GSTT1 and CYP1A1 in sudden infant death syndrome. *Am J Med Genet A* 2006; 140(13): 1447-52.
11. Opdal SH, Opstad A, Vege A, Rognum TO: IL-10 gene polymorphisms are associated with infectious cause of sudden infant death. *Hum Immunol* 2003; 64(12): 1183-9.
12. Opdal SH, Rognum TO: New insight into sudden infant-death syndrome. *Lancet* 2004; 364(9437): 825-6.
13. Forsyth L, Hume R, Howatson A, Busuttil A, Burchell A: Identification of novel polymorphisms in the glucokinase and glucose-6-phosphatase genes in infants who died suddenly and unexpectedly. *J Mol Med* 2005; 83(8): 610-8.
14. Ostman-Smith I, Wettrell G, Keeton B, et al.: Age- and gender-specific mortality rates in childhood hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2008; 29(9): 1160-7.
15. Brinkmann B: Harmonization of medico-legal autopsy rules. Committee of Ministers. Council of Europe. *Int J Legal Med* 1999; 113(1): 1-14.
16. Krous HF: Instruction and reference manual for the International Standardise Autopsy Protocol for sudden unexpected infant death, . *J. SIDS Infant Mortal.* 1996; 1: 203-246.

17. Rodriguez-Garcia MI, Monserrat L, Ortiz M, et al.: Screening mutations in myosin binding protein C3 gene in a cohort of patients with Hypertrophic Cardiomyopathy. *BMC Med Genet* 2010; 11: 67.
18. Roberts JD, Veinot JP, Rutberg J, Gollob MH: Inherited cardiomyopathies mimicking ARVC. *Cardiovasc Pathol* 2009.
19. Morner S, Richard P, Kazzam E, et al.: Identification of the genotypes causing hypertrophic cardiomyopathy in northern Sweden. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35(7): 841-9.
20. Alders M, Jongbloed R, Deelen W, et al.: The 2373insG mutation in the MYBPC3 gene is a founder mutation, which accounts for nearly one-fourth of the HCM cases in the Netherlands. *Eur Heart J* 2003; 24(20): 1848-53.
21. Van Driest SL, Vasile VC, Ommen SR, et al.: Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44(9): 1903-10.
22. Olivetto I, Girolami, F, Ackerman MJ, et al.: Myofibrillar protein gene mutation screening and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc* 2008; 83(6): 630-8.
23. Hershberger RE, Norton N, Morales A, et al.: Coding Sequence Rare Variants Identified in MYBPC3, MYH6, TPM1, TNNC1 and TNNI3 from 312 Patients with Familial or Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* 2010.
24. Bos JM, Poley RN, Ny M, et al.: Genotype-phenotype relationships involving hypertrophic cardiomyopathy-associated mutations in titin, muscle LIM protein, and telethonin. *Mol Genet Metab* 2006; 88(1): 78-85.
25. Richard P, Charron P, Carrier L, et al.: Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* 2003; 107(17): 2227-32.
26. Ingles J, Doolan A, Chiu C, et al.: Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counselling. *J Med Genet* 2005; 42(10): e59.
27. Garcia-Castro M, Coto E, Reguero JR, et al.: [Mutations in sarcomeric genes MYH7, MYBPC3, TNNI2, TNNI3, and TPM1 in patients with hypertrophic cardiomyopathy]. *Rev Esp Cardiol* 2009; 62(1): 48-56.
28. Morita H, Wu J, Zipes DP: The QT syndromes: long and short. *Lancet* 2008; 372(9640): 750-63.
29. Moller DV, Andersen PS, Hedley P, et al.: The role of sarcomere gene mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur J Hum Genet* 2009; 17(10): 1241-9.
30. Carniel E, Taylor MR, Sinagra G, et al.: Alpha-myosin heavy chain: a sarcomeric gene associated with dilated and hypertrophic phenotypes of cardiomyopathy. *Circulation* 2005; 112(1): 54-9.
31. Morita H, Larson MG, Barr SC, et al.: Single-gene mutations and increased left ventricular wall thickness in the community: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2006; 113(23): 2697-705.
32. Miliou A, Anastakis A, D'Cruz LG, et al.: Low prevalence of cardiac troponin T mutations in a Greek hypertrophic cardiomyopathy cohort. *Heart* 2005; 91(7): 966-7.
33. Mogensen J, Murphy RT, Kubo T, et al.: Frequency and clinical expression of cardiac troponin I mutations in 748 consecutive families with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44(12): 2315-25.

34. Van Driest SL, Ellsworth EG, Ommen SR, et al.: Prevalence and spectrum of thin filament mutations in an outpatient referral population with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2003; 108(4): 445-51.
35. Poetter K, Jiang H, Hassanzadeh S, et al.: Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle. *Nat Genet* 1996; 13(1): 63-9.
36. Andersen PS, Havndrup O, Bundgaard H, et al.: Myosin light chain mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy: phenotypic presentation and frequency in Danish and South African populations. *J Med Genet* 2001; 38(12): E43.
37. Schiffmann R: Fabry disease. *Pharmacol Ther* 2009; 122(1): 65-77.
38. Sachdev B, Takenaka T, Teraguchi H, et al.: Prevalence of Anderson-Fabry disease in male patients with late onset hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2002; 105(12): 1407-11.
39. Monserrat L, Gimeno-Blanes JR, Marin F, et al.: Prevalence of fabry disease in a cohort of 508 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50(25): 2399-403.
40. Baptista MV, Ferreira S, Pinho EMT, et al.: Mutations of the GLA gene in young patients with stroke: the PORTYSTROKE study--screening genetic conditions in Portuguese young stroke patients. *Stroke* 2010; 41(3): 431-6.
41. Ingles J, Semsarian C: Sudden cardiac death in the young: a clinical genetic approach. *Intern Med J* 2007; 37(1): 32-7.
42. Colan SD, Lipshultz SE, Lowe AM, et al.: Epidemiology and cause-specific outcome of hypertrophic cardiomyopathy in children: findings from the Pediatric Cardiomyopathy Registry. *Circulation* 2007; 115(6): 773-81.
43. Dettmeyer RB, Kandolf R: Cardiomyopathies--misdiagnosed as Sudden Infant Death Syndrome (SIDS). *Forensic Sci Int* 2010; 194(1-3): e21-4.

Table 1. Analysed genes and mutations

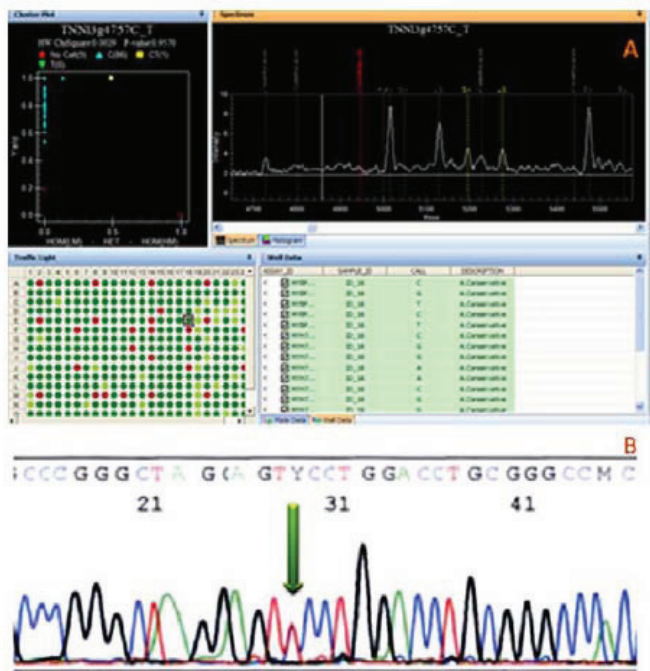
Sarcomeric Protein	Gene	Locus	Analysed Mutations
β -myosin heavy chain	MYH7	14q11.2-q12	279
cardiac myosin-binding protein C	MYBPC3	11p11.2	249
regulatory myosin light chain	MYL2	12q23-q24.3	14
essential myosin light chain	MYL3	3p21.2-p21.3	6
cardiac troponin T	TNNT2	1q32	43
cardiac troponin I	TNNI3	19p13.4	35
troponin C	TNNC1	3p21.1	4
α -tropomyosin	TPM1	15q22.1	14
α -cardiac actin	ACTC	15q14	10
titin	TTN	2q31	10
α -myosin heavy chain	MYH6	14q11.2-q12	6
Other protein			
AMP-acticated protein kinase	PRKAG2	7q35-q36.36	4
telethonin	TCAP	17q12-q21.1	3
α -galactosidase A	GLA	Xq22	1
myosin VI	MYO6	6q13	1
myosin light chain kinase 2	MYLK2	20q13.31	1

Table 2. HCM mutations found in SIDS cases

Cases	Gene	AA change	Nucleotide change	PolyPhen
2	GLA	D313Y	G>T	possibly damaging
2	MYBPC3	S217G	A>G	possibly damaging
1	MYBPC3	D610H	G>C	possibly damaging
1	MYBPC3	A833T	G>A	benign
1	MYBPC3	E907K*	G>A	possibly damaging
1	MYBPC3	P910T	C>A	benign
1	MYBPC3	I1131T	T>C	possibly damaging
1	MYBPC3	E1179K	G>A	benign
1	MYBPC3	A1194T	G>A	benign
1	MYH6	A1004S	G>T	benign
1	MYL2	A13T	G>A	benign
1	TNNI3	S166F	C>T	probably damaging
1	TNNT2	A28V	C>T	benign

*novel mutation

Figure 1. S166F variant in the gene for cardiac troponin I (TNNI3).
(A) Genetic variant analyzed with the Typer v4.0.2. software in the MassArray system (B) Confirmation by direct sequencing.



V. DISCUSIÓN.

En las enfermedades cardíacas los factores genéticos juegan un papel importante. Son responsables no sólo de malformaciones en vasos sanguíneos y en el corazón, que suponen la mayoría de defectos al nacer, sino también de patologías cardiovasculares familiares, por tanto hereditarias, tales como las miocardiopatías o las canalopatías. Se han asociado además a fenotipos complejos no familiares como la aterosclerosis o la hipertensión.

El estudio genético de las patologías implicadas en el desarrollo de un evento tan dramático como el de la muerte súbita cardíaca, que tiene lugar de forma repentina en individuos aparentemente sanos y en un número elevado de jóvenes, es de gran utilidad para el diagnóstico de estas patologías, de gran heterogeneidad fenotípica y genotípica, así como para evaluar su pronóstico y aportar criterios para la elección del tratamiento farmacológico o quirúrgico más adecuado. Estos estudios tienen una aplicabilidad clara en la prevención de familiares portadores de variantes genéticas, asintomáticos o no. A fin de conseguir un diagnóstico personalizado, es necesaria una colaboración estrecha entre la investigación básica y el diagnóstico clínico (historia clínica, antecedentes personales) para el entendimiento de las correlaciones fenotipo-genotipo. Es preciso recoger la máxima información clínica y genética posible de los pacientes y analizarla con datos de individuos sanos de la misma familia y de la población general a fin de lograr una asociación fenotípica-genotípica clara. Se sabe que los individuos portadores de múltiples mutaciones presentan un peor pronóstico por lo que es necesario un mayor seguimiento de la evolución de la patología. La predisposición de este grupo de pacientes a la muerte súbita es elevada, especialmente en los pacientes con MCH con más de una mutación ya que aumenta la predisposición a taquiarritmias ventriculares.

Desde el punto de vista forense, sería plausible la creación de un protocolo estandarizado de autopsia que permita una mejor caracterización de la posible causa de muerte y ayude a guiar el estudio genético posterior.

El entendimiento de las bases genéticas de las patologías implicadas en MSC, de gran heterogeneidad junto con el esclarecimiento de las correlaciones entre el genotipo y el fenotipo es fundamental para establecer una mejor clasificación de estas patologías. El desarrollo de las nuevas tecnologías dará lugar a un avance rápido en este sentido, de modo que el paciente podrá beneficiarse de un diagnóstico concreto y podrá ser evaluado el riesgo entre sus familiares.

Pese a que, hasta el momento, resulta complicada la aplicación de las tecnologías de la biología molecular a la rutina clínica, el avance de la tecnología permitirá que el diagnóstico molecular aporte un dato fundamental en el diagnóstico clínico que ayude a diseñar la estrategia terapéutica más adecuada a cada caso concreto. Los estudios genéticos se llevan a cabo en periodos de tiempo cada vez más breves gracias a la aplicación de estas tecnologías de biología molecular, que permiten además, reducir los costes de dichas pruebas con respecto a los estudios genéticos tradicionales.

Es necesaria la creación de bases de datos informatizadas de acceso público con informa-

ción sobre las bases moleculares que subyacen en las patologías implicadas en el desarrollo de la MSC. Éstas pueden ser una realidad gracias a la aplicación de las estrategias de NGS a la MSC. Estas bases de datos, unidas a la historia familiar y el fenotipo de cada individuo, permitirán establecer una mejor correlación entre el genotipo y el fenotipo de los individuos afectados así como conocer el riesgo potencial de los familiares portadores de variantes genéticas, incluso en portadores asintomáticos.

Para establecer el diagnóstico molecular de las enfermedades hereditarias implicadas en la MSC resulta urgente la creación de grupos de expertos en genética en cada una de éstas. En un caso ideal, estos grupos podrán estudiar el árbol genealógico con la historia clínica de la familia, de modo tal que identifiquen no sólo que se trata de una patología hereditaria sino también el modo de herencia de la misma. Los resultados del estudio genético en el individuo afecto serán de gran utilidad también para los familiares en los que se podrán estudiar las variantes genéticas detectadas. Estos estudios en familiares darán idea de la penetrancia de las variantes genéticas detectadas, ayudando de este modo a esclarecer las correlaciones entre el genotipo y el fenotipo siempre teniendo en cuenta, por un lado, que los factores ambientales pueden influir en la expresión del genotipo y, por otro, la diversidad de fenotipos que se pueden encontrar en individuos portadores de una misma variante.

Las estrategias que hemos desarrollado para el estudio de variantes genéticas descritas permite la obtención de datos en un breve periodo de tiempo: una primera estrategia para detección variantes descritas como implicadas en el desarrollo de MCH y una segunda estrategia diseñada para el estudio de variantes genéticas en el SQT. Ambas estrategias se llevan a cabo mediante la plataforma de alto rendimiento de genotipado Sequenom MassARRAY® System (Sequenom) que, basado en espectrometría de masas, permite el estudio de múltiples variantes en un mismo ensayo, con química Iplex. La tecnología Iplex de Sequenom permite, mediante reacciones multiplex, la detección no sólo de sustituciones de un única base sino también de inserciones, deleciones y sustituciones, una limitación de muchas de las tecnologías de genotipado hoy disponibles. Dicha tecnología permite el genotipado de un alto número de muestras en un tiempo reducido.

En cuanto a la muerte súbita en neonatos, la etiología del SMSL supone un reto tanto para pediatras como para médicos forenses por tratarse de un síndrome sin síntomas previos y con autopsia blanca. Algunas de las cuestiones que se plantean en torno a este síndrome son si la muerte del neonato pudo predecirse y si existe algún factor genético implicado que pueda determinar que el SMSL pueda volver a ocurrir en hermanos o familiares de la víctima y, por tanto, sea necesario el estudio y asesoramiento genético de los padres. Como hemos visto, la incidencia del SMSL se redujo al variar ciertos factores ambientales como, por ejemplo, la posición supina del neonato durante el sueño [184]. Esta campaña no obtuvo el mismo impacto en diferentes países lo que dificulta el cálculo de la incidencia de la patología. La exposición del neonato al humo del tabaco puede desencadenar respuestas intrínsecas en bebés vulnerables.

Se ha propuesto la posibilidad del estudio genético de los genes implicados en la MSC en atletas de alto nivel. Pese a que es objeto de debate, tal vez estos estudios deberían ser aplicados a aquellos atletas con una historia clínica que lo justifique, tales como síncope inexplicado, hallazgos electrocardiográficos o ecocardiográficos sospechosos o historia personal o familiar de MSC. Las posibles aplicaciones del avance en el conocimiento de las bases genéticas de estas patologías, unido al avance de la tecnología, son a día de hoy difíciles de prever. Sin duda, proporcio-

narán estrategias de estudio genético rápido y a bajo coste comparado con el que supone hoy en día el diagnóstico mediante examen clínico exhaustivo.

El estudio genético de la MSC está íntimamente ligado a los factores psico-sociales. Debemos tener presente que los factores éticos deben ser tratados y discutidos. Múltiples circunstancias de la vida de los afectos pueden verse juzgadas y deben ser por tanto reguladas. Alguno de estos ejemplos, que dependen de los diferentes sistemas de salud de los países, son la información accesible para los seguros de vida, la contracepción o los riesgos de la madre y el feto si la madre esta afecta de alguna de las patologías que dan lugar a MSC, así como el diagnóstico prenatal entre otros. Estos problemas de salud y su implicación psico-social deben ser tratados en comités éticos que preserven la privacidad de cada individuo.

VI. CONCLUSIONES.

1. La muerte súbita cardíaca es una de las principales causas de muerte en países desarrollados. La mayoría de los casos se deben a cardiopatía isquémica; sin embargo, las principales causas de muerte súbita en adultos jóvenes menores de 40 años son enfermedades cardiovasculares hereditarias.
2. Las enfermedades cardiovasculares hereditarias responsables de la MSC incluyen miocardiopatías estructurales como la MCH o la MAVD y enfermedades arritmogénicas como el SQTL o el SBr. El estudio genético de estas patologías resulta complicado ya que todas ellas son enfermedades genéticamente heterogéneas, con multitud de genes y variantes genéticas implicadas.
3. El estudio exhaustivo post mórtem en los casos de MSC que incluya el estudio genético es de vital importancia no sólo para determinar la causa real de la muerte sino también para valorar el posible riesgo de la familia a sufrir un evento similar.
4. El empleo de las nuevas tecnologías de genotipado para la detección de mutaciones conocidas, posibilita un estudio rápido, efectivo y de bajo coste. Los nuevos arrays de resecuenciación y, especialmente, las técnicas de secuenciación de nueva generación -que permiten tanto la detección de variantes conocidas como la búsqueda de nuevas variantes- supondrán un gran avance en el conocimiento.
5. La búsqueda de nuevos genes implicados en la MSC a través de estudios de asociación a gran escala (GWAS) o a través de secuenciación de exomas completos, permitirán profundizar en el conocimiento de las bases genéticas y, por tanto, permitirán un diagnóstico genético más preciso.
6. La detección de variantes genéticas asociadas a la MCH y al SQTL por medio de la plataforma de genotipado MassArray de Sequenom, es una estrategia robusta que agiliza y reduce los costes del estudio genético, permitiendo realizar un *screening* inicial en 48h. Las tasas de éxito de genotipado y la confirmación por secuenciación demuestran que dicha tecnología es una estrategia eficaz y altamente fiable para la detección de variantes genéticas implicadas en el la MSC.
7. La estrategia de detección de mutaciones seleccionada ha demostrado ser de gran utilidad para el estudio de muestras degradadas, como pueden ser las de ADN extraído a partir de tejido embebido en parafina, en muchas ocasiones el único material de estudio en los casos de MSC.
8. La flexibilidad del diseño de la estrategia de análisis permite la incorporación constante de las nuevas variantes genéticas que están siendo descritas constantemente.
9. La variante genética Gln689His en MYBPC3, detectada *de novo* en una familia de Italia,

podría ser la responsable de la MCH en dicha familia. La ausencia de la variante en 244 alelos de referencia y la predicción *in silico* como “*posiblemente perjudicial*” apoyan la posible patogenicidad de dicha variante.

10. El significado funcional de las variantes genéticas detectadas en muchos casos de MCH y SQTL es completamente desconocido. La dificultad de realización de estudios funcionales, sumado al gran número de genes y de variantes genéticas a estudiar, hacen de los modelos informáticos de predicción de la patogenicidad una herramienta orientativa útil.
11. De acuerdo con publicaciones previas, nuestro estudio demuestra una mayor frecuencia de MSC en varones jóvenes que en mujeres, evento que ocurre, en gran parte de los casos, sin ningún síntoma premonitorio.
12. El estudio genético de MCH y SQTL en casos de MSC y en familiares directos, ha permitido desenmascarar la variante genética implicada en un 8% de los casos de MSC (4/49) y en un 19% de los familiares directos (11/57).
13. A pesar de la ausencia de trastornos estructurales en las autopsias practicadas en los casos de SMSL, el estudio de mutaciones conocidas de MCH ha demostrado la presencia de algunas variantes genéticas previamente descritas en la literatura como responsables de MCH.
14. La falta de información acerca de muchas de las mutaciones descritas en la literatura, la dificultad para realizar estudios funcionales con proteínas de la sarcómera y la ausencia de hipertrofia o desorganización de los miocitos en los casos de SMSL estudiados, dificulta la comprensión de dicho hallazgo, pero abre nuevas puertas al conocimiento de las bases genéticas subyacentes al SMSL.

VII. ANEXOS.

Anexo I: Modelos de consentimiento informado para estudio genético de la muerte súbita.



CONSENTIMIENTO INFORMADO “ESTUDIO GENÉTICO DE LA MUERTE SÚBITA CARDIACA

Se le está pidiendo que participe en una investigación sobre la causa genética de la Muerte súbita cardiaca. Su participación es totalmente voluntaria. Por favor, lea detenidamente la información que sigue y haga cualquier pregunta que desee aclarar antes de aceptar la participación.

OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN:

La muerte súbita cardiaca supone la muerte de aproximadamente 335.000 adultos cada año en Estados Unidos y 100.000 en el Reino Unido. En España muestra una incidencia baja, sobre 40/100,000 por año, pero aun así representa un 10% de las muertes totales. En población inferior a 35 años la mayoría son causadas por cardiomiopatías y arritmias hereditarias.

Se estima que aproximadamente en un 4% de las muertes súbitas en Europa no se puede identificar una causa tras la reacción fatal, y en la gran mayoría existe una base genética. Cuando la muerte súbita cardiaca ocurre de forma inesperada los familiares cercanos poseen un riesgo potencial de alguna reacción cardiaca fatal.

En este estudio planeamos estudiar el componente genético de la muerte súbita cardiaca, analizando genes que ya previamente en la literatura fueron descritos con alguna asociación, como son los genes de la miocardiopatía hipertrófica (MCH), genes del Síndrome de QT largo (SQTL) y Brugada (SBr), y genes de la displasia/miocardiopatía arritmogénica de ventrículo derecho (D/MAVD).

En aquellas familias en las que se consigue identificar una mutación responsable, esta mutación puede ser analizada en aquellas personas que así lo deseen para conocer qué riesgo tienen de presentar algún síntoma o de transmitir la mutación a sus hijos.

Si en su caso no se encuentran mutaciones en estos genes la muestra quedará almacenada en el laboratorio del Grupo de Medicina Xenómica de la Universidad de Santiago de Compostela para poder llevar a cabo nuevos análisis a medida que genes y análisis vayan estando disponibles. En cualquier momento usted puede solicitar que la muestra sea retirada del laboratorio y destruida.

PROCEDIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN:

Si acepta participar en la presente investigación, Le será requerida la obtención de unos 10-20 ml de sangre del niño/la, que será utilizada para extraer el ADN. La muestra de ADN será conservada y podrá ser usada posteriormente en otros estudios, salvo que usted manifieste lo contrario señalándolo al final de este documento. Además, se recogerán en un formulario: el informe de la autopsia, los datos personales y los antecedentes familiares.

BENEFICIOS Y RIESGOS DE LA PARTICIPACIÓN:

El resultado de esta investigación puede desvelar una mutación (alteración genética) responsable de la muerte súbita cardiaca en el caso de su familia. Este conocimiento puede ser de gran importancia para sus familiares y otras familias afectas. Los resultados de esta investigación que puedan ser de beneficio para usted o su familia le serán comunicados en un informe. Si usted no desea recibir información sobre los resultados



SERVIZO
GALEGO
de SAÚDE

**Complexo Hospitalario Universitario
de Santiago de Compostela**
Santiago de Compostela



del análisis genético deberá marcar con una X la casilla correspondiente al final de este documento.

Un resultado negativo no excluye que el síndrome sea heredable, ya que podría estar causado por una mutación no analizada. Como consecuencia del análisis también es posible que se identifiquen cambios genéticos de significado no claro, es decir, que no se sepa con certeza si la mutación encontrada es o no la causa de la muerte, con la posible incertidumbre que esto pueda generar.

Su participación no tiene ninguna compensación económica y no supone gasto alguno para usted. Su atención médica no se verá afectada por el hecho de que participe o no en esta investigación.

Cualquier información sobre los genes que pueda surgir como hallazgo colateral no buscado a través de los análisis genéticos que se van a efectuar no será comunicada.

CONFIDENCIALIDAD:

Los datos de esta investigación se utilizarán de acuerdo a la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal. La información genética concerniente a la muestra se guardará de manera anónima e independiente de los datos personales. Sólo los investigadores responsables del proyecto podrán analizar conjuntamente los datos clínicos y genéticos. Se tomarán las medidas necesarias para impedir que cualquier información referente a su persona o los resultados del análisis sean accesibles a personas ajenas a la presente investigación, excepto en los casos en que fuera requerido por ley.



En algunas ocasiones podría ser de utilidad realizar el análisis genético a otros miembros de su familia. En ningún caso serán contactadas otras personas de su familia con este propósito sin su permiso.

REVOCACIÓN DO CONSENTIMENTO:

Es usted libre de cambiar de opinión en cualquier momento y revocar el presente consentimiento, caso en el que la muestra será destruida. Esto en ningún caso conllevará ningún perjuicio para usted.

Para cualquier duda o cuestión relacionada con el proyecto, no dude en contactar con la investigadora responsable del mismo:

Dra. María Brión Martínez
Complexo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS), Grupo de Medicina
Xenómica-USC
Tel: 981582327 os 981594488 ext.12311

	SERVIZO GALEGO de SAÚDE Complexo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela Santiago de Compostela	
<p>Leí y comprendí el presente documento. Todas mis preguntas sobre la investigación fueron respondidas de forma satisfactoria.</p> <p>D./Dña.,</p> <p>(responsable legal de), doy mi consentimiento para participar en la presente investigación.</p> <p>NOMBRE CÓDIGO:..... INVESTIGADOR RESPONSABLE:.....</p> <p>No deseo conocer los resultados del análisis genético No deseo que la muestra sea conservada para otros análisis que puedan surgir en el futuro</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 20px;"> <div style="width: 45%;"> <p>Fecha y firma del paciente o responsable legal</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>Fecha y firma del médico que ofrece la participación en el estudio</p> </div> </div> <p>REVOCO EL PRESENTE CONSENTIMIENTO</p> <div style="text-align: center; margin-top: 40px;"> <p>Fecha y firma del paciente o responsable legal</p> </div>		
3		



SERVIZO
GALEGO
de SAÚDE

**Complexo Hospitalario Universitario
de Santiago de Compostela**
Santiago de Compostela



CONSENTIMIENTO INFORMADO

“ESTUDIO GENÉTICO DEL SÍNDROME DE MUERTE SÚBITA INFANTIL (SMSI)”

Se le está pidiendo que participe en una investigación sobre la causa genética del Síndrome de muerte súbita infantil (SMSI). Su participación es totalmente voluntaria. Por favor, lea detenidamente la información que sigue y haga cualquier pregunta que desee aclarar antes de aceptar la participación.

OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN:

En países desarrollados, la muerte súbita infantil representa la mayor causa de muerte entre niños de entre un mes y un año de edad. Los estudios epidemiológicos describieron una serie de factores ambientales relacionados como dormir de lado o boca abajo, o la exposición al tabaco, sin embargo, la causa de la muerte súbita infantil es aún desconocida. Hasta el momento un número extenso de teorías fueron expuestas para explicar este síndrome, pero todas ellas hablan de factores genéticos y ambientales.

En este proyecto planeamos estudiar el componente genético del Síndrome de muerte súbita infantil, analizando genes de patologías que ya previamente fueron asociadas con la muerte súbita (trastornos de la conducción cardíaca y miocardiopatías).

En aquellas familias en las que se consigue identificar una mutación responsable, esta mutación puede ser analizada en aquellas personas que así lo deseen para conocer qué riesgo tienen de presentar algún síntoma o de transmitir la mutación a sus hijos.

Si en su caso no se encuentran mutaciones en estos genes la muestra quedará almacenada en el laboratorio del Grupo de Medicina Xenómica de la Universidad de Santiago de Compostela para poder llevar a cabo nuevos análisis a medida que genes y análisis vayan estando disponibles. En cualquier momento usted puede solicitar que la muestra sea retirada del laboratorio y destruida.

En la actualidad el conocimiento de la mutación responsable en una familia concreta no tiene implicación directa en el tratamiento. Sin embargo, cabe esperar que cuanto más conozcamos sobre las alteraciones genéticas de este síndrome más cerca estaremos de su prevención.

PROCEDIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN:

Si acepta participar en la presente investigación, Le será requerida la obtención de unos 10-20 ml de sangre del niño/la, que será utilizada para extraer el ADN. La muestra de ADN será conservada y podrá ser usada posteriormente en otros estudios, salvo que usted manifieste lo contrario señalándolo al final de este documento. Además, se recogerán en un formulario: el informe de la autopsia, los datos personales y los antecedentes familiares.

BENEFICIOS Y RIESGOS DE LA PARTICIPACIÓN:

El resultado de esta investigación puede desvelar una mutación (alteración genética) responsable del SMSI en el caso de su familia. Este conocimiento puede ser de gran importancia para sus familiares y otras familias afectas. Los resultados de esta



SERVIZO
GALEGO
de SAÚDE

**Complexo Hospitalario Universitario
de Santiago de Compostela**
Santiago de Compostela



investigación que puedan ser de beneficio para usted o su familia le serán comunicados en un informe. Si usted no desea recibir información sobre los resultados del análisis genético deberá marcar con una X la casilla correspondiente al final de este documento.

Un resultado negativo no excluye que el síndrome sea heredable, ya que podría estar causado por una mutación no analizada. Como consecuencia del análisis también es posible que se identifiquen cambios genéticos de significado no claro, es decir, que no se sepa con certeza si la mutación encontrada es o no la causa de la muerte, con la posible incertidumbre que esto pueda generar.

Su participación no tiene ninguna compensación económica y no supone gasto alguno para usted. Su atención médica no se verá afectada por el hecho de que participe o no en esta investigación.

Cualquier información sobre los genes que pueda surgir como hallazgo colateral no buscado a través de los análisis genéticos que se van a efectuar no será comunicada.

CONFIDENCIALIDAD:

Los datos de esta investigación se utilizarán de acuerdo a la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal. La información genética concerniente a la muestra se guardará de manera anónima e independiente de los datos personales. Sólo los investigadores responsables del proyecto podrán analizar conjuntamente los datos clínicos y genéticos. Se tomarán las medidas necesarias para impedir que cualquier información referente a su persona o los resultados del análisis sean accesibles a personas ajenas a la presente investigación, excepto en los casos en que fuera requerido por ley.


En algunas ocasiones podría ser de utilidad realizar el análisis genético a otros miembros de su familia. En ningún caso serán contactadas otras personas de su familia con este propósito sin su permiso.

REVOCACIÓN DO CONSENTIMIENTO:

Es usted libre de cambiar de opinión en cualquier momento y revocar el presente consentimiento, caso en el que la muestra será destruida. Esto en ningún caso conllevará ningún perjuicio para usted.


Para cualquier duda o cuestión relacionada con el proyecto, no dude en contactar con la investigadora responsable del mismo:

Dra. María Brión Martínez
Complexo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS), Grupo de Medicina
Xenómica-USC
Tel: 981582327 o 981594488 ext.12311



SERVIZO
GALEGO
de SAÚDE

Complexo Hospitalario Universitario
de Santiago de Compostela
Santiago de Compostela



USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Leí y comprendí el presente documento. Todas mis preguntas sobre la investigación fueron respondidas de forma satisfactoria.

D./Dña. _____,
responsable _____ legal _____ de
_____, doy mi
consentimiento para participar en la presente investigación.

NOMBRE _____ DEL
NIÑO/A _____
CÓDIGO _____ DEL
NIÑO/A: _____
INVESTIGADOR _____
RESPONSABLE: _____

No deseo conocer los resultados del análisis genético
No deseo que la muestra sea conservada para otros análisis que puedan surgir en el futuro

Fecha y firma del responsable legal

Fecha y firma del médico que ofrece
la participación en el estudio

REVOCO EL PRESENTE CONSENTIMIENTO

Fecha y firma del responsable legal

6

Anexo II: Material suplementario de la estrategia de detección de variantes genéticas implicadas en el desarrollo de MCH.

Gen	Variante genética (cambio aminoácido)	Ensayo	Cebador 1-PCR	Cebador 2- PCR	Tamaño amplicon (pb)	Concentración Cebadores PCR (nM)	Cebador reacción de Extensión	Concentración primer ext (µM)
ACTC	P166A	W24	ACGTTGGATGAGGCATGCTCTGACCTG	ACGTTGGATGATCCAGACGCGATGATGGC	113	100	gggagAACGGTAGAGCCCTCATAGATGG	14
ACTC	Y168C	W32	ACGTTGGATGAGATGACAGACGGATGATGGC	ACGTTGGATGAGGCAATGTTCTGAGCACTGG	113	100	tgggcCTCAATGTGTCCTCCATCT	11,66
ACTC	A222V	W12	ACGTTGGATGAGCGAGGTTCATACCTCTTC	ACGTTGGATGATGTCGCCCTGGATTTTG	100	100	AATGAGATGGCCAG	7
ACTC	A333P	W2	ACGTTGGATGATGCCAGACAGATATTACGC	ACGTTGGATGGGAATCTCAGACATTCACGG	99	100	TTGTTTCTCTCGAGATTAAT	11,66
ACTC	A297S	W2	ACGTTGGATGATACAGGGTACATAGTGGTG	ACGTTGGATGATGACATGATATATCCGC	95	100	TGATATCCGACAGCAATTAAT	9,33
ACTC	E101K	W17	ACGTTGGATGATGCTTCTCCGGTTGGCTG	ACGTTGGATGACCTCTCACATGAGCTGCG	110	100	gghaaATGAGATCCGTTGTTGCTCC	14
ACTC	M307L	W7	ACGTTGGATGATATCCGACAGCACTGATG	ACGTTGGATGCTCTCTCGATAGCATCGC	104	100	ATACGATCAGCAATACAGGGTACA	14
ACTC	R314H	W11	ACGTTGGATGATCTGAGGACAGCAATATG	ACGTTGGATGATGAGCAGGATGATTTCTTC	86	100	CAGTGATTTCTCTTGCATA	9,33
ACTC	E383G	W2	ACGTTGGATGATGCCCTCCACCAATCTG	ACGTTGGATGATGAGCAATTTGGGTGGAC	100	100	ACATGGATGGGCTGCTCATCTGATAC	14
ACTC	S273F	W32	ACGTTGGATGATGCTCTGGGATATCAATG	ACGTTGGATGATGAGTCTGCTCCAGGTA	111	100	CGTTCACAGTATGGAAAT	7
GLA	D313Y	W20	ACGTTGGATGATGCTGATGATGGCAATTAAG	ACGTTGGATGATGCTATGTAACCTCGACAC	98	100	cTCCAAAGCTCTCTTCAG	7
MYBPC3	IVS12-1G_C	W36	ACGTTGGATGAGGCCACAGTAGCTTGGCCT	ACGTTGGATGATGAGCGGCTCAGCTTCTTT	120	100	ggagcGCTCCAGCTTCTCTGAAAG	14
MYBPC3	Q386X	W37	ACGTTGGATGAGGGCTGAGGGGTGGTCT	ACGTTGGATGGGAATCTGTGGCCTTTGCTC	95	100	GTAGCGCGCTCCAGCTTCTTCT	11,66
MYBPC3	P371R	W38	ACGTTGGATGATGATGCTCAGCCAGTTCCAC	ACGTTGGATGCTCAGCTTTTCAGAAAGC	107	100	CAGCTTTTCAGAAAGAGCTGGAGC	11,66
MYBPC3	T384fs	W35	ACGTTGGATGAGGCCATCTTGAAGCAATTG	ACGTTGGATGAGGTGAGCAAGGCCACAG	101	100	ggAGGCCACAGATCCGGCTGACC	11,66
MYBPC3	D388fs	W16	ACGTTGGATGAGGCCATCTTGAAGCAATTG	ACGTTGGATGAGGTGAGCAAGGCCACAG	101	100	ccccGCTGACCCGTGGAACTGGGTGAC	14
MYBPC3	H390fs	W22	ACGTTGGATGAGGTGAGCAAGGCCACAG	ACGTTGGATGGGCCATCTTGAAGCAATTG	101	100	gggaaATTGAACTCAGCGCTAATG	14
MYBPC3	A392delG	W34	ACGTTGGATGAGGTGAGCAAGGCCACAG	ACGTTGGATGGGCCATCTTGAAGCAATTG	101	100	ggaATTCTTGAAGCAATTGAACTCAG	11,66
MYBPC3	IVS13-6A_G	W5	ACGTTGGATGATATATATCTCTGTCGCC	ACGTTGGATGAACAACCTCAACGCCCTTC	101	100	ACTTCAAGGCCCTTCTCTCTAC	11,66
MYBPC3	GSR	W5	ACGTTGGATGATGATGAGCTCTCAGAGATG	ACGTTGGATGAACCCAGCTCTTAAAGCTAC	82	100	TCCTAAAGCTACCTGGCTCTTCTCC	7
MYBPC3	IVS14-13G_A	W11	ACGTTGGATGACGATGAGACTCAAGATG	ACGTTGGATGGGCACTTTCTGCTCCACTT	81	100	TGCGACGATGGAAGCTCA	7
MYBPC3	F412fs	W38	ACGTTGGATGAGCTTCTGTCAGCTTCTCT	ACGTTGGATGATGATGCTGAGGATGAGCTTG	99	100	TTGGGGCCCCCAGCCAGCTAGATCT	14
MYBPC3	F412fs	W30	ACGTTGGATGATGATGCTCAGGATACGCTTG	ACGTTGGATAGCTTCTCTCCACTTCCCT	99	100	ACCCAGGTACATTTTGAATCATC	14
MYBPC3	G416S	W15	ACGTTGGATGCCAATGAGCACTGCTGATG	ACGTTGGATGACCCAGGATCAATCTTGAG	86	100	GGCTGCTGCTGCCAATGAGCACT	14
MYBPC3	Q425X	W4	ACGTTGGATGATCTTTGATCCATCGGTG	ACGTTGGATGACCCAGGATGATGAGTGG	103	100	ACTTCTGCCACCCACC	7
MYBPC3	V437fs	W24	ACGTTGGATGCCATCAGCACTGCTCATATG	ACGTTGGATGTTTCAAAAGACTCCGGTC	106	100	ctAGTGTGCTGGGGTGGC	9,33
MYBPC3	E441K	W32	ACGTTGGATGTTTCAAAAGACTCCGGTC	ACGTTGGATGCCATCAGCAAGCTGCTCATG	106	100	acccGGCCCCACTTTTCACAAA	7
MYBPC3	L448fs	W19	ACGTTGGATGTTGGGTGGGCGAGAGTGTAG	ACGTTGGATGATGTTTCCCATCTCTCAGGT	90	100	attTGTAGCAGGAGCTCTTTGTGAAA	14
MYBPC3	E451Q	W20	ACGTTGGATGACAGGTCTCCCAATCTCCAC	ACGTTGGATGAAGGTGATGACAGGAGCTCTT	80	100	GCTCACTCTGCTGGACA	7
MYBPC3	IVS15-1G_A	W9	ACGTTGGATGATCACAGCTGCTCTCCCAA	ACGTTGGATGAGCCAGCCTCATGCTCAC	98	100	CTGCTGGACAGAGCCC	7
MYBPC3	P452fs	W12	ACGTTGGATGATCACAGCTGCTCTCCCAA	ACGTTGGATGAGCCAGCCTCATGCTCAC	98	100	AGCCCCCTGTGCTCATCA	7
MYBPC3	T457M	W33	ACGTTGGATGATCACAGCTGCTCTCCCAA	ACGTTGGATGAGCCAGCCTCATGCTCAC	98	100		

Estudio genético de la muerte súbita cardíaca: Miocardiopatía Hipertrófica Familiar y Síndrome de QT Largo.

Gen	Variante genética (cambio aminoácido)	Ensayo	Cebador i-PCR	Cebador 2- PCR	Tamaño amplión (pb)	Concentración Cebadores PCR (nM)	Cebador reacción de Extensión	Concentración primer ext (µM)
MTBPC3	R469H	W5	ACGTTGGATGACTCAAACTCCACCCCTG	ACGTTGGATGAACTCAATGCTACCCCTG	120	100	GAGCCCCCTGTGCTCATCAGCG	9,33
MTBPC3	R470Q	W33	ACGTTGGATGTTGGAGGACCACTGCTGAT	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	82	100	ACACTCAAACTCCACCC	7
MTBPC3	R470Q	W10	ACGTTGGATGTTGGAGGACCACTGCTGAT	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	82	100	ACACTCAAACTCCACCC	7
MTBPC3	V471E	W34	ACGTTGGATGTTGGAGGACCACTGCTGAT	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	82	100	ACACTCAAACTCCACCC	11,66
MTBPC3	W468X	W35	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	120	100	ccatcttgatgtggggcagccggg	7
MTBPC3	IVS16-6C_A	W37	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	105	100	CGTGTCTGTGGAATCACC	7
MTBPC3	IVS16-1G_A	W36	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	105	100	TTGCCACCCACCCACCC	7
MTBPC3	G490R	W35	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	105	100	ACCCACCCACCCGCTA	7
MTBPC3	R495W	W32	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	113	100	CCACCCCGCTAGGCTGAGGAC	11,66
MTBPC3	R495Q	W5	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	113	100	ggggTTTTGAGGTTCTCTCC	9,33
MTBPC3	R502W	W8	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	116	100	GAAACCGTATTGAGTCTCTCC	14
MTBPC3	R502Q	W7	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	96	100	TGCCGCTCTCTTGAAC	9,33
MTBPC3	K504DEL	W29	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	96	100	TCTCTGCCGCTCTCTTGAAC	9,33
MTBPC3	G507R	W4	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	90	100	tagaaCTTCAATACCGGTTCAAG	11,66
MTBPC3	G523W	W6	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	90	100	GATGATCAGGTGTGTCTCTGCC	11,66
MTBPC3	Y525S	W38	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	114	100	CACAGTGTGATGTGCC	7
MTBPC3	G531R	W5	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	114	100	gGGAGGACCGGGGCACT	7
MTBPC3	A534fs	W36	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	107	100	CAATGAGCTACACCCACCCCTGGCCCC	14
MTBPC3	IVS11-45G_C	W35	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	82	100	acCCTGTGACAAATGAGCTCAGCAGC	14
MTBPC3	E542Q	W22	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	113	100	ctacCTGTCTCCCATTTGTAGACA	11,66
MTBPC3	IVS17+1G_C	W23	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	110	100	ctaaGCTGCCCCCCCAGCCAGGCTCAC	14
MTBPC3	IVS17+2T_C	W8	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	110	100	gGCGTGTGCTGAGCTATTGTCCAGG	14
MTBPC3	IVS17+4A_T	W7	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	110	100	AGCTCAATTGTGAGGG	7
MTBPC3	E542fs	W14	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	110	100	AGCTCAATTGTGAGGG	7
MTBPC3	V547fs	W37	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	110	100	CTGGTACACTCCAGCTTCTTT	11,66
MTBPC3	M557T	W38	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	99	100	ggCTGGGATGCTCTGTGTAC	9,33
MTBPC3	K565X	W3	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	99	100	CCGCTGTGCTTTTGGGCCACC	11,66
MTBPC3	C566R	W4	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	100	100	GGGCCAAAGGACCAAGCGGCTGTTC	14
MTBPC3	E567fs	W25	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	100	100	GCCCAAAGCACAGCGCTGTTCACAA	14
MTBPC3	S589fs	W23	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	117	100	taaaCTCCAAATCTCTATGTGAGACC	11,66
MTBPC3	S593fs	W15	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	117	100	ggaaCAGACCGGCTAAAGGTG	7
MTBPC3	G596E	W33	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	117	100	CCGCTAAAGGTGTTC	14
MTBPC3	G596E	W33	ACGTTGGATGTTGAAGTATCGGAGAGGG	ACGTTGGATGTTCTCGATATCTGCACATC	104	100	GCCGCATAAAGGTGTCCCATGCG	14

Gen	Variante genética (cambio aminoácido)	Ensayo	Cebador 1-PCR	Cebador 2- PCR	Tamaño amplicón (pb)	Concentración Cebadores PCR (nM)	Concentración primer ext (µM)	Cebador reacción de Extensión
MTBPC3	R597W	W35	ACGTTGGATGACAGCCGACATAAAGGTGTC	ACGTTGGATGTCTGTCTCCACTACGTCTC	104	100	9,33	cCCACTGCCCTGCACACTCAAC
MTBPC3	K600fs	W31	ACGTTGGATGTGAGCCACTGCTGCTCCCTGC	ACGTTGGATGACAAAGCTGTGACTGACGCTC	101	100	14	cgggGAGGTGTGTAATGTGTCAGTT
MTBPC3	D604V	W30	ACGTTGGATGACAAAGCTGTGACTGACGCTC	ACGTTGGATGATCGACAGGGTCCAAACTGGA	86	100	7	CCACAACCTGACCATTG
MTBPC3	D605N	W10	ACGTTGGATGACAAAGCTGTGACTGACGCTC	ACGTTGGATGATCGACAGGGTCCAAACTGGA	86	100	14	AGGCTCCAAACTGACCAATTGAC
MTBPC3	P608L	W6	ACGTTGGATGTGGGCGACAAAGCTGTGACTC	ACGTTGGATGACAAAGCTGTGACTGACGCTC	83	100	11,66	AACCTGACCAATGACGAGCTCAAC
MTBPC3	D610H	W35	ACGTTGGATGACAAAGCTGTGACTGACGCTC	ACGTTGGATGATCGACAGGGTCCAAACTGGA	83	100	9,33	AAAGCTGTGACTGACCTGTGTT
MTBPC3	E619K	W30	ACGTTGGATGTGAGATGAGACTTGGCTGGCTAC	ACGTTGGATGTGACAGCTCAAGCTCAGCTGC	108	100	7	ctACTACAGCTTGTGCCC
MTBPC3	A627V	W12	ACGTTGGATGAGCAGGCTCAACCATAAAGT	ACGTTGGATGAGGCTGACTACAGGCTTGTG	97	100	9,33	ctCGCTGCACCTGTGAG
MTBPC3	IVS19-2A_G	W23	ACGTTGGATGCCAAGCTTACCTGCTGCTG	ACGTTGGATGTGCTACTTGTCTCTCTCTC	89	100	9,33	caaggGCTCTTCTCTCTCTGTC
MTBPC3	G642X	W37	ACGTTGGATGTCTCTCTTCTGTCAGAGTTC	ACGTTGGATGTGACAGCAACAGACTCAG	101	100	7	GGGCCCCAAGACTTACCT
MTBPC3	IVS20-2A_G	W6	ACGTTGGATGCTCCGCTTCTCTGAACTAC	ACGTTGGATGCAATGTCTGTCTGTATGCGG	107	100	7	TGGATCTTGGGAGGTTTC
MTBPC3	R654H	W1	ACGTTGGATGTGTGTCTCTGTCAGAACCTC	ACGTTGGATGTGTCACACACATGTGTGTC	95	100	11,66	CAACACAAATGTGTCTGTATG
MTBPC3	R668H	W15	ACGTTGGATGACCAATGTGTGTGTGACTGG	ACGTTGGATGTCTTCTGCCAGATCAGAGTGG	103	100	7	GAGATAGGGAGCTCCAGA
MTBPC3	R668P	W20	ACGTTGGATGACCAATGTGTGTGTGACTGG	ACGTTGGATGTCTTCTGCCAGATCAGAGTGG	103	100	7	AGATAGGGAGCTCCAGA
MTBPC3	V671fs	W19	ACGTTGGATGACCAATGTGTGTGTGACTGG	ACGTTGGATGTGATGCGCTTCTGCCAGATC	109	100	14	aaAGTGGGAGGAGGTCCCAAGAT
MTBPC3	P671L	W24	ACGTTGGATGTAGAGCTCTTCTGCCAGATCAC	ACGTTGGATGTGAGTAAGCTTACAGTCTGG	92	100	7	cCCCTACTCTTGGGGACC
MTBPC3	W683X	W9	ACGTTGGATGTACGTCTGGACGTCCCTATC	ACGTTGGATGTCCACACACCTGCTGTATG	97	100	7	CGTGATAGCTTCTGC
MTBPC3	IVS20+1 G_A	W22	ACGTTGGATGTGATCTGGCAGAGGCTATC	ACGTTGGATGTGTCACACACCTATCTATG	96	100	7	ttAGGAGGGACCCACAGTA
MTBPC3	IVS21+2	W14	ACGTTGGATGTGTCACACACCTATCTATG	ACGTTGGATGTGTCACACCTATCTATG	96	100	9,33	tcAGGAGGCTATCAGCAGG
MTBPC3	IVS20-3DEL	W25	ACGTTGGATGTGTCACCTGTCTCTCTGG	ACGTTGGATGTGTCCTCTACTTCCCTC	109	100	9,33	gTTCCCTCTGCCCTGTCTCC
MTBPC3	A693S	W22	ACGTTGGATGTGTCACCTGTCTCTCTGG	ACGTTGGATGTGTCCTCTACTTCCCTC	107	100	11,66	gaCCTGTCTCCAGGGGAAAG
MTBPC3	A696fs	W26	ACGTTGGATGTGTCACCTGTCTCTCTGG	ACGTTGGATGTGTCCTCTACTTCCCTC	107	100	9,33	attggCCTCTGGGGCACTGTGG
MTBPC3	P696fs	W12	ACGTTGGATGTGTCACCTGTCTCTCTGG	ACGTTGGATGTGTCCTCTACTTCCCTC	107	100	7	CCAGCCAGGCGACGCC
MTBPC3	IVS21-5C_T	W37	ACGTTGGATGTGAGAGATCTGGGCTCTGTG	ACGTTGGATGTGATCTCACCCACACTCTG	112	100	11,66	ATCTCACCCCACTGTGACCCC
MTBPC3	IVS22-2delA	W32	ACGTTGGATGTGTCACCCCAACTCTGGAC	ACGTTGGATGTGAGATGCTGGGGCTCTG	109	100	14	ccaggGCCCTGTGTCTCAGCAGCAGC
MTBPC3	R733C	W22	ACGTTGGATGTGTCACCTCTCTCTCTGCC	ACGTTGGATGTGTCCTCTCTCTCTGCC	111	100	9,33	tttGTGAGAACCCAGGAC
MTBPC3	G740fs	W21	ACGTTGGATGAGGGTCTCTCACTGTGACCG	ACGTTGGATGAAAGGACCGCAGGATCTTCAC	120	100	9,33	aggGAAGGAAGATGAGGGGCG
MTBPC3	D745G	W31	ACGTTGGATGAGGACCGCAGCATCTTCAC	ACGTTGGATGACAGGGTCTTCACTGTGAC	100	100	11,66	aaaggGACCCGTGTAGAGGCCCTCA
MTBPC3	Y749X	W27	ACGTTGGATGTGTGAGGTGTGACCTGTGTC	ACGTTGGATGTGAGGTGTGAGGTGTGACCTG	97	100	11,66	ggggtGAAGATGAGGGGCTCTTA
MTBPC3	Y749X	W27	ACGTTGGATGTGAGGTGTGAGGTGTGACCTG	ACGTTGGATGTGAGGTGTGAGGTGTGACCTG	97	100	11,66	ggggtGTCTTCTACTGTGACCTT
MTBPC3	V753fs	W18	ACGTTGGATGTGAGGTGTGAGGTGTGACCTG	ACGTTGGATGTGAGGTGTGAGGTGTGACCTG	100	100	7	cGCCCAACAGGGTCTTCTCA
MTBPC3	N755K	W13	ACGTTGGATGTGACTGTGAGGTGTGACCTG	ACGTTGGATGTGAGGTGTGAGGTGTGACCTG	100	100	7	ACGGTCCACGTGAAGAA

Estudio genético de la muerte súbita cardíaca: Miocardiopatía Hipertrófica Familiar y Síndrome de QT Largo.

Gen	Variante genética (cambio aminoácido)	Ensayo	Cebador 1-PCR	Cebador 2- PCR	Tamaño amplicón (pb)	Concentración Cebadores PCR (nM)	Concentración primer ext (µM)
MYBPC3	P756fs	W28	ACGTTGGATGTTGACGTGTGAGGTGACCTG	ACGTTGGATGGCAGAGGAGGAGATGAGGG	100	100	14
MYBPC3	V757M	W22	ACGTTGGATGTTGACGTGTGAGGTGACCTG	ACGTTGGATGGCAGAGGAGGAGATGAGGG	100	100	14
MYBPC3	G758D	W2	ACGTTGGATGGCAGAGGAGGAGATGAGGG	ACGTTGGATGTTGACGTGTGAGGTGACCTG	100	100	7
MYBPC3	V768fs	W35	ACGTTGGATGACACAGGCTCAAGTCAAGAAC	ACGTTGGATGCTGTGTCTCCAGCTTGAC	118	100	7
MYBPC3	D770N	W6	ACGTTGGATGGCTCTGTGTCTCTCCAGCTTG	ACGTTGGATGGCTCAACCTCAAGTCAAG	85	100	11,66
MYBPC3	IVS23+1G_A	W9	ACGTTGGATGGCTCTGTGTCTCTCCAGCTTG	ACGTTGGATGGCTCAACCTCAAGTCAAG	85	100	11,66
MYBPC3	IVS23+1G_T	W29	ACGTTGGATGGCTCTGTGTCTCTCCAGCTTG	ACGTTGGATGGCTCAACCTCAAGTCAAG	85	100	7
MYBPC3	IVS23+18C_G	W21	ACGTTGGATGACCTCAAGTCAAGTCAATC	ACGTTGGATGACCTCAAGTCAAGTCAATC	106	100	11,66
MYBPC3	IVS23-26A_G	W33	ACGTTGGATGACCTCAAGTCAAGTCAATC	ACGTTGGATGACCTCAAGTCAAGTCAATC	116	100	11,66
MYBPC3	IVS23-2A_G	W30	ACGTTGGATGCTCCACGTTGCTGCTCTTG	ACGTTGGATGCTCCACGTTGCTGCTCTTG	98	100	7
MYBPC3	V771M	W8	ACGTTGGATGCTCCACGTTGCTGCTCTTG	ACGTTGGATGCTCCACGTTGCTGCTCTTG	120	100	14
MYBPC3	D786Y	W36	ACGTTGGATGCTTGCACTCAACCAAGGATG	ACGTTGGATGCTTGCACTCAACCAAGGATG	114	100	9,33
MYBPC3	W792fs	W39	ACGTTGGATGCTTGCACTCAACCAAGGATG	ACGTTGGATGATGATCAAGCAACCTGGAGAG	110	100	11,66
MYBPC3	insG791	W32	ACGTTGGATGCTTGCACTCAACCAAGGATG	ACGTTGGATGATGATCAAGCAACCTGGAGAG	110	100	14
MYBPC3	W792R	W9	ACGTTGGATGCTTGCACTCAACCAAGGATG	ACGTTGGATGATGATCAAGCAACCTGGAGAG	109	100	7
MYBPC3	W792X	W34	ACGTTGGATGCTTGCACTCAACCAAGGATG	ACGTTGGATGATGATCAAGCAACCTGGAGAG	109	100	9,33
MYBPC3	P794fs	W8	ACGTTGGATGCTTGCACTCAACCAAGGATG	ACGTTGGATGATGATCAAGCAACCTGGAGAG	109	100	9,33
MYBPC3	R810H	W5	ACGTTGGATGTTCCAGACCAGACTGCCAC	ACGTTGGATGGAATCAGCTCGAGTTCCAGC	120	100	14
MYBPC3	R811R	W3	ACGTTGGATGTTCCAGACCAGACTGCCAC	ACGTTGGATGGAATCAGCTCGAGTTCCAGC	120	100	14
MYBPC3	K811del	W20	ACGTTGGATGGAATCAGGTTGAACTTCAAGC	ACGTTGGATGACGACGAGCTACATCTGGAG	92	100	11,66
MYBPC3	Y816X	W34	ACGTTGGATGACGACGAGCTACATCTGGAG	ACGTTGGATGGAATCAGGTTGAACTTCAAGC	92	100	7
MYBPC3	R817G	W35	ACGTTGGATGGAATCAGGTTGAACTTCAAGC	ACGTTGGATGACGACGAGCTACATCTGGAG	92	100	14
MYBPC3	M819fs	W26	ACGTTGGATGACGACGAGCTACATCTGGAG	ACGTTGGATGATGATCAAGTCAAGTTCGAG	101	100	7
MYBPC3	R820Q	W33	ACGTTGGATGACGACGAGCTACATCTGGAG	ACGTTGGATGATGATCAAGTCAAGTTCGAG	101	100	7
MYBPC3	H831fs	W21	ACGTTGGATGACGACGAGCTACATCTGGAG	ACGTTGGATGATGATCAAGTCAAGTTCGAG	102	100	7
MYBPC3	A833T	W7	ACGTTGGATGGCTGCACTCTGACCTGATTC	ACGTTGGATGTAGACGCGCATCTGCTACAC	101	100	11,66
MYBPC3	A833V	W40	ACGTTGGATGTAGACGCGCATCTGCTACAC	ACGTTGGATGGCTGCACTCTGACCTGATTC	101	100	7
MYBPC3	R834W	W23	ACGTTGGATGGCTGCACTCTGACCTGATTC	ACGTTGGATGTAGACGCGCATCTGCTACAC	101	100	7
MYBPC3	Y842X	W33	ACGTTGGATGTAGACGCGCATCTGCTACAC	ACGTTGGATGATGATCAAGTCAAGTTCGAG	106	100	7
MYBPC3	E843X	W17	ACGTTGGATGTAGACGCGCATCTGCTACAC	ACGTTGGATGATGATCAAGTCAAGTTCGAG	106	100	7
MYBPC3	R845fs	W29	ACGTTGGATGTAGACGCGCATCTGCTACAC	ACGTTGGATGTAGACGCGCATCTGCTACAC	106	100	14
MYBPC3	R845fs	W20	ACGTTGGATGTAGACGCGCATCTGCTACAC	ACGTTGGATGTAGACGCGCATCTGCTACAC	106	100	14

Gen	Variante genética (cambio aminoácido)	Ensayo	Cebador 1-PCR	Cebador 2- PCR	Tamaño amplicón (pb)	Concentración Cebadores PCR (nM)	Cebador reacción de Extensión	Concentración primer ext (µM)
MTBPC3	Y847X	W27	ACGTTGGATGTGGACATGCGCATGGCGTT	ACGTTGGATGTGAGGAGCTAGCTCATGAG	109	100	cttttACGAGATGCGGCTCTA	9,33
MTBPC3	Y847fs	W10	ACGTTGGATGAGGGCGGTGTGTAGAGATG	ACGTTGGATGTCACCGATAGCGATGAGGG	114	100	TGGACATCGGATGGCGGTGACCG	14
MTBPC3	A851V	W19	ACGTTGGATGTGTACGAGATGGCGGTCTAC	ACGTTGGATGATAGGAGCGGTGGAGA	99	100	cttggGGCGCTGGACATGCCGATG	11,66
MTBPC3	B826fs	W32	ACGTTGGATGTACCGATAGGCGATGAGGG	ACGTTGGATGTGTACAGATGTGGGTCTAC	106	100	TCTACCGCGGTCAACGCC	7
MTBPC3	A851fs	W13	ACGTTGGATGTGTACGAGATGGCGGTCTAC	ACGTTGGATGTCCACCGATAGGCGATGAGGG	105	100	GCGCCCTGGACATGCGG	9,33
MTBPC3	B826fs	W36	ACGTTGGATGTACCGATAGGCGATGAGGG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	106	100	GTCTACGGGTGTACACGCCAT	14
MTBPC3	B826fs	W5	ACGTTGGATGTACCGATAGGCGATGAGGG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	105	100	GATGCGGTCTACGCGGTCAAAGGCAT	9,33
MTBPC3	G853fs	W9	ACGTTGGATGTACCGATAGGCGATGAGGG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	105	100	TCTACGGGTGTACACGCCATGCG	9,33
MTBPC3	A859fs	W22	ACGTTGGATGTACCGATAGGCGATGAGGG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	105	100	HCGCCCTGGCTCCCAAGCGCTT	11,66
MTBPC3	P873H	W7	ACGTTGGATGTGTCTGTCTGTCTCTCTCTG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	91	100	GTCTCTACTGTCCAGTGGGGTG	14
MTBPC3	W890X	W9	ACGTTGGATGTGTCTGTCTGTCTCTCTCTG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	111	100	CTGACACACCGGTCTCCCTCAAGTG	14
MTBPC3	V898M	W1	ACGTTGGATGTGTCTGTCTGTCTCTCTCTCTG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	102	100	TGTAGCCATTCAGGCTCTGCTGCCA	9,33
MTBPC3	Y904fs	W38	ACGTTGGATGTGTCTGTCTGTCTCTCTCTCTG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	120	100	GGGCGAGTACTCCACGCTGT	14
MTBPC3	P910T	W35	ACGTTGGATGTGTCTGTCTGTCTCTCTCTCTG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	110	100	IGCTACAGCGTGGAGTACTGC	9,33
MTBPC3	INS26+1+2DELGT	W25	ACGTTGGATGTGTCTGTCTGTCTCTCTCTCTG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	102	100	cttggGGAGTACTGCCAGAGGGGGTG	14
MTBPC3	INS26+1G_A	W14	ACGTTGGATGTGTCTGTCTGTCTCTCTCTCTG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	102	100	GGGGGCGGGGGGACACTCA	7
MTBPC3	INS26-3	W12	ACGTTGGATGTGTCTGTCTGTCTCTCTCTCTG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	117	100	TCCCTCTCCACGCC	7
MTBPC3	S828L	W30	ACGTTGGATGTGTCTGTCTGTCTCTCTCTCTG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	119	100	ggggCAGGTCTCTCACCAGTATC	11,66
MTBPC3	T936M	W4	ACGTTGGATGTGTCTGTCTGTCTCTCTCTCTG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	99	100	CATCGATACTGTGAGGAGCCTGCCA	14
MTBPC3	R943X	W8	ACGTTGGATGTGTCTGTCTGTCTCTCTCTCTG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	99	100	ATATGTGTCCCGCACTC	9,33
MTBPC3	R945fs	W16	ACGTTGGATGTGTCTGTCTGTCTCTCTCTCTG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	100	100	aaaGGCTGCTTTTCCGAGTG	9,33
MTBPC3	R945G	W35	ACGTTGGATGTGTCTGTCTGTCTCTCTCTCTG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	100	100	GCTGCTTTTCCGAGTGC	7
MTBPC3	N948T	W26	ACGTTGGATGTGTCTGTCTGTCTCTCTCTCTG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	89	100	cttctTTTCCGAGTGCAGGAGACACA	11,66
MTBPC3	P955fs	W6	ACGTTGGATGTGTCTGTCTGTCTCTCTCTCTG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	96	100	TCACCGGTCTCTGTGTGTGTAC	11,66
MTBPC3	T957S	W40	ACGTTGGATGTGTCTGTCTGTCTCTCTCTCTG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	96	100	cttctCTGTGAGCGCCCTGTGA	9,33
MTBPC3	T958I	W30	ACGTTGGATGTGTCTGTCTGTCTCTCTCTCTG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	96	100	CTGTCAACGGCTCCGTG	7
MTBPC3	V984L	W23	ACGTTGGATGTGTCTGTCTGTCTCTCTCTCTG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	112	100	ggtTACCACACCGAGCGGTGACA	14
MTBPC3	Q889X	W15	ACGTTGGATGTGTCTGTCTGTCTCTCTCTCTG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	100	100	TGCACAAAGGGGCACTCAC	9,33
MTBPC3	INS27+1G_A	W10	ACGTTGGATGTGTCTGTCTGTCTCTCTCTCTG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	100	100	TGCACAAAGGGGCACTCAC	7
MTBPC3	INS27+27C_A	W34	ACGTTGGATGTGTCTGTCTGTCTCTCTCTCTG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	100	100	TGCACAAAGGGGCACTCAC	14
MTBPC3	Q888E	W11	ACGTTGGATGTGTCTGTCTGTCTCTCTCTCTG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	96	100	gggCAGCTATAGCTCTCTCTCCCTG	9,33
MTBPC3	Q888R	W14	ACGTTGGATGTGTCTGTCTGTCTCTCTCTCTG	ACGTTGGATGTGTACAGATGGCGGTCTAC	96	100	TTAAGCTTTTCTCTCTCT	9,33
MTBPC3							GTAAAGCTTTTCTCTCTCTCT	

Estudio genético de la muerte súbita cardíaca: Miocardiopatía Hipertrófica Familiar y Síndrome de QT Largo.

Gen	Variante genética (cambio aminoácido)	Ensayo	Cebador i-PCR	Cebador 2- PCR	Tamaño amplión (pb)	Concentración Cebadores PCR (nM)	Cebador reacción de Extensión	Concentración primer ext (µM)
MYBPC3	R102Q	W6	ACGTTGGATGTTGGAGTGAATGCACAGTTGAC	ACGTTGGATGCTCTTGGTCCAGGTCAC	100	100	TCTTTGTGTCAGGTCACTTGAGGC	14
MYBPC3	Q1012X	W1	ACGTTGGATGTTGGAGTGAATGCACATCTC	ACGTTGGATGTTTCTCCCTCAGGGCAA	111	100	CAGGTGACCTGGACCAAGAGGGG	11,66
MYBPC3	E1017R	W8	ACGTTGGATGAGGTGACCTGGACCAAGAG	ACGTTGGATGTGAACAGGATGGTCTCTGTG	104	100	TCTTTGGGATGCTCACTCTCT	11,66
MYBPC3	R1022P	W24	ACGTTGGATGAGGTGACCTGGACCAAGAG	ACGTTGGATGTGAACAGGATGGTCTCTGTG	104	100	CGCAGGAGGTGAGCATCC	7
MYBPC3	N1028fs	W29	ACGTTGGATGAGGTGACCTGGACCAAGAG	ACGTTGGATGTGAACAGGATGGTCTCTGTG	105	100	eeegTGTGTGTCTGTGGGCTGT	14
MYBPC3	T1042fs	W40	ACGTTGGATGAGACCACTCTGTTCAATCC	ACGTTGGATGTGCAATGTCTTCAATGGCAC	103	100	tgagCACGTCACTCGTAAAGT	11,66
MYBPC3	1042msA	W34	ACGTTGGATGAGACCACTCTGTTCAATCC	ACGTTGGATGTGCAATGTCTTCAATGGCAC	103	100	cttagCACCTCACTGCTAAGT	11,66
MYBPC3	T1048M	W39	ACGTTGGATGGCTTGTCTCCATGTTCTC	ACGTTGGATGAGACCACTCTGTTCAATCC	110	100	cttgaATTCAAGGCACTTACAGGTGA	14
MYBPC3	V1047fs	W21	ACGTTGGATGACCACTCTGTTCAATCCG	ACGTTGGATGGCTGTCTCTCCATGTTCTC	108	100	ttaacCAATGTTCTCAATGGGCAC	11,66
MYBPC3	Q1061X	W16	ACGTTGGATGTGAGAACATGGAGACAAGG	ACGTTGGATGTGAGGAAGGGAACAAGGG	109	100	CCACGCCACCAACACT	7
MYBPC3	V1062fs	W26	ACGTTGGATGTGAGAACATGGAGACAAGG	ACGTTGGATGTGAGGAAGGGAACAAGGG	114	100	gaggGGCCAACCAACAAC	9,33
MYBPC3	INS27-21A_G	W22	ACGTTGGATGGAGGACTTGTGCTGTCTG	ACGTTGATGATGATGACCCCTCTCTCACTGT	95	100	gaggCAGGAGGCGGTGTGACCC	11,66
MYBPC3	K1065fs	W16	ACGTTGGATGTGACCACTGGGTCTGTCT	ACGTTGGATGATTAAGACCCAGGCTCAG	101	100	acesGGGGAGGACTTGGCTTG	11,66
MYBPC3	K1087N	W21	ACGTTGGATGTTTCTGCACTGTGTACCCC	ACGTTGGATGGGTCTTAATGTGGCTCTGG	100	100	gcttcaATTGTGCTCTGGAGTGGAA	14
MYBPC3	E1096	W11	ACGTTGGATGTTCTGTGTGGCTTCTGTGAC	ACGTTGGATGTTAAATGTGGCTCTGGAGTGG	105	100	GGAATGTGGCAACAAG	7
MYBPC3	W1098er	W14	ACGTTGGATGTTCTGTGTGGCTTCTGTGAC	ACGTTGGATGTTAAATGTGGCTCTGGAGTGG	105	100	TGGATGTGGCAACAACGAGCTCTG	14
MYBPC3	INS29T_G	W28	ACGTTGGATGTGCAGAAAGCCGACAAGAAG	ACGTTGGATGTGCAGAGGGGTGCACTGGG	87	100	ggCCCCACACCTTGGGCTC	9,33
MYBPC3	INS29+2G_C	W29	ACGTTGGATGCTAGCAAGGCTGACGTGG	ACGTTGGATGTGCAGAAAGCCGACAAGAAG	87	100	ccccCAAGAAGACCATGTGTGA	9,33
MYBPC3	F1131I	W12	ACGTTGGATGAGAGATGCTCCCTCCCT	ACGTTGGATGATGATGAGCTCTGGCACAC	113	100	GGTAAATGCTCCAAAGACGTGGA	11,66
MYBPC3	V1151I	W9	ACGTTGGATGAGATGCTCCCTCCCT	ACGTTGGATGATGATGAGCTCTGGCACAC	113	100	GTCGCGGCTAATGTCTCAAGA	11,66
MYBPC3	C1124X	W24	ACGTTGGATGTGAMAGACCGGAACTAGTAG	ACGTTGGATGTCAACGCTTTGGAGCATTAAC	104	100	ccccGCATTACCGCCGACCACTG	14
MYBPC3	V1125M	W10	ACGTTGGATGTCAACCGCTTGGAGCATTAAC	ACGTTGGATGTGAAGACCGGAACTAGTAG	104	100	ATGAGCTTGGGACCA	7
MYBPC3	I1131T	W8	ACGTTGGATGTGAMAGACCGGAACTAGTAG	ACGTTGGATGTCAACCGCTTTGGAGCATTAAC	104	100	ACTCTGTGTGTGCGACAGCTCATCA	14
MYBPC3	INS30+1G_A	W7	ACGTTGGATGAGCCCTGTGTGGAAGAATG	ACGTTGGATGCCAAGAGGCCCTCTTTATC	82	100	AGGAGCCCTCTTTATTCGCCAGACAG	14
MYBPC3	INS31-14-(9)DEL	W36	ACGTTGGATGTAGCTTGTGTGGCTCTCG	ACGTTGGATGTAGCTTGTGTGGCTCTCG	102	100	TGGCTAATAGTGTGTGTCTGTGG	14
MYBPC3	E1179K	W39	ACGTTGGATGCCAATAAGCCCTGGAC	ACGTTGGATGTGACAGAGATAGCATGTAG	116	100	GAGCTGGGTGAAGCTTGGGGCCT	11,66
MYBPC3	T1184N	W38	ACGTTGGATGACGACAGCATAGCATGTGTAG	ACGTTGGATGTAAAGGCCCTGGAGCTTCTC	111	100	ttatCGAGGCCCAAGCTTCA	9,33
MYBPC3	L1187R	W37	ACGTTGGATGACGACAGCATAGCATGTGTAG	ACGTTGATGTAAAGGCCCTGGAGCTTCTC	111	100	AGGCCCAAGCTTCAACCAAGCCCC	11,66
MYBPC3	A1194T	W10	ACGTTGGATGAGCCCTGGACTTCTCCGAC	ACGTTGGATGTGACACAGAGCATATAGCAG	113	100	ATACAGCTGTGAGCCCG	7
MYBPC3	C1202fs	W40	ACGTTGGATGGCTAAAGTCTCTACCTTG	ACGTTGGATGTGGTGAAACCGCTGGTGCAT	104	100	ctttagACATCATATGCTCTCT	14
MYBPC3	G1206D	W27	ACGTTGGATGTGACCAAGGCTCTAAAGTTC	ACGTTGGATGTATGATGATGATGCTCTGCTG	87	100	ccccCTCTGTGTGTGTGTGTGGG	11,66
MYBPC3	G1206V	W32	ACGTTGGATGTATGATGATGATGCTCTGCTG	ACGTTGGATGTGACACAGGCCCTAAAGTTC	87	100	cgAAAGTTTCTCTAGCTTGGGGCTA	11,66

Estudio genético de la muerte súbita cardíaca: Miocardiopatía Hipertrófica Familiar y Síndrome de QT Largo.

Gen	Variante genética (cambio aminoácido)	Ensayo	Cebador 1-PCR	Cebador 2- PCR	Tamaño amplión (pb)	Concentración Cebadores PCR (nM)	Cebador reacción de Extensión	Concentración primer ext (µM)
MYBPC3	IVS5-2A_C	W8	ACGTTGGATGTGTCTCTCCGGCCCTCTGGT	AGCTTGGATGTGATGTGTCAGCTCGAAG	98	100	CAGCTCGACACATAGACC	9.33
MYBPC3	V219L	W11	ACGTTGGATGTGTGTGATGTGTCAGCTCGAA	ACGTTGGATGTGTCTCTCCGGCCCTGGT	101	100	CGCCCGTCTCATGTGCACACAG	11.66
MYBPC3	D228N	W26	ACGTTGGATGTCTCTGTGGACACCTTCMA	ACGTTGGATGTCTATCTCTGTGAGCTGGAC	99	100	gaTATCTGTTCGAGTGCACATCACC	14
MYBPC3	S236G	W12	ACGTTGGATGTCTATCTCTGTGACACTGC	ACGTTGGATGTCTCTCTGTGACACTGC	102	100	tACACCTCAGACGCTGAC	9.33
MYBPC3	V273S	W17	ACGTTGGATGTGTGAGCTGCACATCAC	ACGTTGGATGTGCATTAATTTGTCTGTGTGG	103	100	atTGTGTCTGTGTGGACAC	9.33
MYBPC3	E240D	W39	ACGTTGGATGTCTATCTCTGTGACCTGTCAC	ACGTTGGATGTGGACAGTCAAAATTTGTCC	116	100	atTGTGGACACTTCACAGCCGG	9.33
MYBPC3	F247C	W32	ACGTTGGATGTGCTCTTCACTGGCAGCTAC	ACGTTGGATGCCGTGACAGTGAATTTGAAG	100	100	ATTTGTCTGTGTGGACAC	9.33
MYBPC3	D248E	W13	ACGTTGGATGTGCTTCACTGGCAGCTAC	ACGTTGGATGCCAGAGTGAATTTGAAG	100	100	gGGACAGTGAAGATTGAAGTTGGACCA	14
MYBPC3	V256I	W5	ACGTTGGATGAGCCAGACAGACACACAG	ACGTTGGATGCCACCAAGACAATTTGAC	98	100	CTGCTCCAACTTCAATCTCACT	9.33
MYBPC3	H257P	W6	ACGTTGGATGAGCCAGACAGACACACAG	ACGTTGGATGCCACCAAGACAATTTGAC	98	100	CACCTTCAATCTCACTGTC	9.33
MYBPC3	E258K-IVS6+1G_A	W26	ACGTTGGATGAGCCAGACAGACACACAG	ACGTTGGATGCCACCAAGACAATTTGAC	98	100	eeeTCAATCTCACTGTCAC	7
MYBPC3	IVS6+5G_A	W44	ACGTTGGATGCACTTCAATCTCACTGTCC	ACGTTGGATGAGAGTAGGACACAGGAC	107	100	CAGACACAGGGCCCC	11.66
MYBPC3	G263R	W3	ACGTTGGATGATCTCTCCACCCTTTGAAC	ACGTTGGATGGAGGCTCATAGGAGTTC	86	100	GCTGATGAGGAGTCCAGGTCTC	7
MYBPC3	R273H	W7	ACGTTGGATGCAGACTCAGGACTGGCCT	ACGTTGGATGAGACCTGGACCTCTATA	101	100	CTATCAGCTTTCGCC	11.66
MYBPC3	IVS7+1G_A_T	W42	ACGTTGGATGTGAAGGGCTCAGACTCCAG	ACGTTGGATGTGAGACTCTCTATCAGCCTTC	105	100	CTCTATCAGCCTTTCGCCGAC	14
MYBPC3	IVS7-3C_T	W13	ACGTTGGATGTGAAGGGCTCAGACTCCAG	ACGTTGGATGTGAGACTCTCTATCAGCCTTC	105	100	cCCTATCAGCCTTTCGCCGACGTGA	11.66
MYBPC3	IVS7+5G_A	W36	ACGTTGGATGCGAGGTGAGGATACTGAGTC	ACGTTGGATGTCTCGGATGTGGAGGTAG	120	100	CGACCACTTCAGCCAGGCTCT	9.33
MYBPC3	G278E	W18	ACGTTGGATGTCTCGGATGTGGTAGGTAG	ACGTTGGATGATCTGAGTCTAACCCCCAC	110	100	caCCAGAGGAGCTGGCTG	9.33
MYBPC3	G279A	W7	ACGTTGGATGATCTGAGTCTAACCCCCAC	ACGTTGGATGTCTCGGATGTGGAGGTAG	110	100	GGGTACTGATCCGCCGACCA	9.33
MYBPC3	R282W	W12	ACGTTGGATGTCTCGGATGTGTGAGGTAG	ACGTTGGATGATCTGAGTCTAACCCCCAC	110	100	CTTGGCTGGAGGTGTGG	7
MYBPC3	IVS8-20C_A	W35	ACGTTGGATGTCTCTCTATATCCCTTTC	ACGTTGGATGATGTCTCTCTATGCTATGAC	100	100	ATGAGAGGGGACCCCA	11.66
MYBPC3	F305fsdelTT	W34	ACGTTGGATGTCTATGTGTGGGCACTCAAC	ACGTTGGATGATGTGCGACACTCACTCTTC	100	100	CAACCCCTTGGACGACAGT	7
MYBPC3	IVS10-9	W26	ACGTTGGATGTAGATCTCCACACAGTC	ACGTTGGATGTGATCTTCCGCCGCCACAG	109	100	ggaaTCCGGCCACAGCTATAGACTGC	11.66
MYBPC3	IVS11+2A_G	W7	ACGTTGGATGGGCAAGGCTAGACTGGG	ACGTTGGATGTGATGATCTCCACAGCTTC	97	100	TGTTGTCTCTCAGCTTGAGTCCC	14
MYBPC3	L325del	W38	ACGTTGGATGTGCTGTGACTACAGATGG	ACGTTGGATGACAGAGGACTGAGCTGG	107	100	ceegGGAGAGACGTGTGTGGAGATCC	9.33
MYBPC3	R326Q	W44	ACGTTGGATGACACAGGACTCGAAGCTGG	ACGTTGGATGTGCTCTGTGACTACAGATGG	107	100	CTCAGATGGGGTGTCTGC	7
MYBPC3	Q327fs	W31	ACGTTGGATGGATGGCTCTACTACAGATG	ACGTTGGATGAAGTGTGAGGACACACAGA	95	100	agGGAGATCTTAGGGACAG	14
MYBPC3	E334K	W37	ACGTTGGATGTGGGAGATCTACGGGAC	ACGTTGGATGTGAGCTCTTTAGCATTTGCC	117	100	CCCGCTACTGAGCGCATGTCCT	14
MYBPC3	Y340X	W39	ACGTTGGATCATCTGAGTACAGGCGATC	ACGTTGGATGTGCCCTTGAAGCTCTTTAG	96	100	ceeeCCCGCGCAGGTCACTGACGCC	9.33
MYBPC3	V342D	W21	ACGTTGGATCATCTGAGTACAGGCGATC	ACGTTGGATGTGCCCTTGAAGCTCTTTAG	96	100	ggggTGTGCCGCCAGGCTCACTG	11.66
MYBPC3	T343fs	W41	ACGTTGGATGATGGCTTGAAGCTCTTTAG	ACGTTGGATGTGATCTGAGTGGAGGCGAT	96	100	ceeeTCTTCTCAGTACGGGCTCA	11.66
MYBPC3	R346fs	W43	ACGTTGGATGTCTCTCTATCCGCCCTCAT	ACGTTGGATGATCTGATACAGGCCATC	119	100	ggggGCACTGACCTGCGCGTCA	11.66

Gen	Variante genética (cambio aminoácido)	Ensayo	Cebador 1-PCR	Cebador 2- PCR	Tamaño amplicón (pb)	Concentración Cebadores PCR (nM)	Cebador reacción de Extensión	Concentración primer ext (µM)
MYB3	L352P	W4	ACGTTGGATGAGTACGGGCTCATTGACCTG	ACGTTGGATGACCACTTGTGCTCTTCTC	101	100	CTTCTCATCGCGCTCATGCCCTTG	11,66
MYB3	R356W	W35	ACGTTGGATGGATGCTCTAAGAGGCTCAAG	ACGTTGGATCTCTCAGCAAGGGCTAACTG	88	100	aaactGTGTCTCTTCTCTCATCGCGCC	14
MYB3	A384T	W36	ACGTTGGATGCTCTCTCCCTCTGAGGAAG	ACGTTGGATGCTCTCTCCCTCTGAGGAAG	98	100	GATGAGAGAAGAGACA	7
MYB3	I1512+1G_A	W34	ACGTTGGATGCTCTCTCCCTCTGAGGAAG	ACGTTGGATGCTCTCTCCCTCTGAGGAAG	98	100	GATGAGAGAAGAGACA	9,33
MYH6	R795Q	W14	ACGTTGGATGACCTGCGCTTCACTATCTTC	ACGTTGGATGATCACTACCGGCTGACG	97	100	ATGCAAGCCCAAGCC	7
MYH6	I820N	W33	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	101	100	GCTGTGTAATCAAGTGAACA	9,33
MYH6	P830L	W30	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	97	100	TTGAATGAGAGCTTCACTCCAG	9,33
MYH6	A104S	W27	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	100	100	aaiaaCAGGCGCTCTGATGG	9,33
MYH6	Q1065H	W20	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	104	100	ctttcGGCGGCACTGAACTGAGCCCA	14
MYH6	E1457K	W28	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	89	100	gggacCGGCGAGATCTTGCC	11,66
MYH7	D394fs	W9	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	103	100	CTCATGGGGCTGAACACTCAGCGACC	14
MYH7	V404X	W10	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	112	100	CTCATGGGGCTGAACACTCAGCGACC	9,33
MYH7	V404fs	W11	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	112	100	TGTTGAGCTACTCATGCGCCACTTT	14
MYH7	T412N	W12	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	103	100	CCACCTGCTGAGACTTCTGCGCTTG	14
MYH7	S532P	W27	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	93	100	ctaaiaATGCACTCTCTCTTCCAGATGG	14
MYH7	E535G	W38	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	116	100	TGGGGATCATGCTTCCATCTCG	9,33
MYH7	G571R	W20	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	98	100	AGCCACGCCAATATCAAG	7
MYH7	G571R	W18	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	98	100	ctaaiaAAGTGGGCTTCAAGCTTCC	11,66
MYH7	H576R	W1	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	98	100	GGCATAGTGTGATCAGGGAGAAG	11,66
MYH7	A430E	W12	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	108	100	TTGAACATCTCTCATACACT	11,66
MYH7	G584R	W6	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	87	100	CCACTTCTCTCTGATCAGTATGCC	14
MYH7	D587V	W20	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	90	100	gggaaAGCCAGCCAAATGATGTTGTAG	14
MYH7	L601V	W3	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	93	100	CCACAGACATCTCTATGGA	9,33
MYH7	L601F	W39	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	102	100	CCACAGACATCTCTATGGA	7
MYH7	N625S	W26	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	93	100	GACCAAGGATCTCTCA	7
MYH7	V606M	W29	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	86	100	ceetctCTCTCATGAGACTGTC	11,66
MYH7	V606L	W17	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	86	100	caangCTCTCATGAGACTGTC	11,66
MYH7	K611N	W6	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	100	100	GAGACTCTGTGGGCTGTGATCAGAA	14
MYH7	K615Q	W7	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	100	100	TGTATACAAAGTCTTCCCTC	9,33
MYH7	K615N	W1	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	87	100	GAGACTCTGTGGGCTGTGATCAGAA	14
MYH7	Y624N	W42	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	97	100	GCTTGTATACAAAGTCTTCCCTCA	9,33
MYH7	S642L	W6	ACGTTGGATGATGATGAGGCAATCTTTGAC	ACGTTGGATGATGATGATGATGATGATG	88	100	CAGCACTCTGTTTGGCAC	9,33
							GCAAGGCCCAAGAAAGGCT	

Estudio genético de la muerte súbita cardíaca: Miocardiopatía Hipertrófica Familiar y Síndrome de QT Largo.

Gen	Variante genética (cambio aminoácido)	Ensayo	Cebador i-PCR	Cebador 2- PCR	Tamaño amplicón (pb)	Concentración Cebadores PCR (nM)	Concentración primer ext (µM)	Cebador reacción de Extensión
MYH7	Y501W	W11	ACGTTGGATGTGCAGCAGCTTCTTCAACC	AGGTTGATGATGAATGTCTACTGATGCC	99	100	9,33	CTCGATGTCCTCTCTCTTG
MYH7	R652G	W5	ACGTTTGATGATGAGAAGGCTGCTCTTCAG	ACGTTTGATGATGAATGTGCGTGGCTCTTC	89	100	7	CTGTGTCCCACTCACC
MYH7	M659I	W25	ACGTTTGATGATGAGTACAAAGCTGGGATG	ACGTTTGATGTGTGCACCTTTTGGCCACAGG	98	100	14	aaacGGAAATCTGAAACAGCTAT
MYH7	R663S	W43	ACGTTTGATGTGCCACAGGAAATCTGAAAC	ACGTTTGATGATGATACAGCTTACAAAGTGG	92	100	7	GTGGGATGGGTGGAGC
MYH7	R663H	W19	ACGTTTGATGTGCCACAGGAAATCTGAAAC	ACGTTTGATGATACAGAGCTTCAAAGTGG	92	100	11,66	GTGGGATGGGTGGAGC
MYH7	R671C	W3	ACGTTTGATGTGGAGAGCTTGTCTCATTAAG	ACGTTTGATGATGACCTTGTCTCATTAAG	82	100	9,33	CCCAATCCCTACTTTGTAC
MYH7	A550V	W11	ACGTTTGATGTGGAGAGAGTGCATGTTTC	ACGTTTGATGATGAGTGTGGCGATTTTG	113	100	9,33	GTGTGTGTCAACACAGCTTG
MYH7	G584S	W7	ACGTTTGATGTGGCAGCAATGATTTGTAG	ACGTTTGATGATGACCAAGCTATCAAGGG	108	100	14	GCCCACTTCTCTGATCCACTATGCC
MYH7	G595R	W15	ACGTTTGATGTGCATGTGACTACACATC	ACGTTTGATGTCTTGATACAGCCACGAC	102	100	11,66	ATTGAGAGGATCTTGTCTTC
MYH7	G595R	W12	ACGTTTGATGTGCATGTGACTACACATC	ACGTTTGATGTCTTGATACAGCCACGAC	102	100	11,66	ATTGAGAGGATCTTGTCTTC
MYH7	R694C	W10	ACGTTTGATGTGCAGGGGTGATGGACAC	ACGTTTGATGATGCCCTCCAGCACCAT	86	100	7	CCAGCACACCATTCGAG
MYH7	R694H	W15	ACGTTTGATGTGCACACCCCTGTGTATGCAC	ACGTTTGATGTGGAAGCTTTCTGTGCAGATG	95	100	9,33	GCCCTCCAGCACCA
MYH7	N696S	W5	ACGTTTGATGTGCACACCCCTGTGTATGCAC	ACGTTTGATGTGGAAGCTTTCTGTGCAGATG	95	100	14	CTCGAGATGGGATGCCCTCCAGC
MYH7	V698A	W3	ACGTTTGATGTGCACACCCCTGTGTATGCAC	ACGTTTGATGTGGAAGCTTTCTGTGCAGATG	94	100	9,33	atGAAAGGCTTCCCAACC
MYH7	R712L	W36	ACGTTTGATGTGCACACCCCTGTGTATGCAC	ACGTTTGATGTGGAAGCTTTCTGTGCAGATG	94	100	7	CCAAACCGCATCTCTAC
MYH7	G716R	W27	ACGTTTGATGTCTCTGTGTCCACCCCTATAC	ACGTTTGATGTATCTGAGCAAGGCTTC	98	100	9,33	gaatCTATACCACTCTGCC
MYH7	R719W	W24	ACGTTTGATGTGAAGGCTTCCCAACCCGAT	ACGTTTGATGTGTCTATGAGCTTCTGTGG	99	100	14	ctTCTCTCTACGGGGACTTCC
MYH7	R719Q	W25	ACGTTTGATGTGTCTATGAGCTTCTGTGG	ACGTTTGATGTGAAGGCTTCCCAACCCGAT	99	100	9,33	CTGTGTGCACCTCATACCACTCTGC
MYH7	R719P	W11	ACGTTTGATGTGAAGGCTTCCCAACCCGAT	ACGTTTGATGTGTCTATGAGCTTCTGTGG	99	100	14	gCTTCTCTCTCAGGTAT
MYH7	R723G	W27	ACGTTTGATGTGAAGCTTCTCTCAGGATG	ACGTTTGATGTGTGTGAGCTCTCGACACTTC	92	100	7	GACACTCTCTCTCAGTAT
MYH7	R723C	W1	ACGTTTGATGTGAAGCTTCTCTCAGGATG	ACGTTTGATGTGTGAGCTCTCTGACACTTC	92	100	9,33	atGACTCTGAAACCCAGGG
MYH7	A729P	W22	ACGTTTGATGTGCCCTTCTCTGTATCAATG	ACGTTTGATGTGAGTATGCAATCTCTGAAC	86	100	7	CTCGAAACAGCGGCCA
MYH7	I730N	W36	ACGTTTGATGTGCCCTTCTCTGTATCAATG	ACGTTTGATGTGAGTATGCAATCTCTGAAC	86	100	9,33	ccagCAATGACTGTCTCTCA
MYH7	P731I	W16	ACGTTTGATGTGCAGTATGCATCTGAAAC	ACGTTTGATGTGCAGTATGCATCTGAAATG	86	100	14	ggatTCTCTGTATCAATGAAGTGT
MYH7	G733E	W30	ACGTTTGATGAGTATGCAATCTCTGAACCC	ACGTTTGATGTGCCCTTCTCTGTATCAATG	84	100	9,33	gaaTCTCTGTATCAATGAAGT
MYH7	Q734E	W24	ACGTTTGATGAGTATGCAATCTCTGAACCC	ACGTTTGATGTGCCCTTCTCTGTATCAATG	86	100	14	ccctCCCCCTCTCTCATCAATGAC
MYH7	I736V	W17	ACGTTTGATGTATGCAATCTCTGAACCCAGC	ACGTTTGATGTGTGATCAATGCTCCAGGGAG	117	100	9,33	ccctTCTCTGAGGACAGTTC
MYH7	I736V	W24	ACGTTTGATGTATGCAATCTCTGAACCCAGC	ACGTTTGATGTGTGAAACCCAGCGGCCAT	92	100	9,33	ggtCCCCCTTCTGTCTATCA
MYH7	I736M	W18	ACGTTTGATGTATGCAATCTCTGAACCCAGC	ACGTTTGATGTGTGAAACCCAGCGGCCAT	92	100	7	CTCGAGGACAGTTCAT
MYH7	I736M	W23	ACGTTTGATGTATGCAATCTCTGAACCCAGC	ACGTTTGATGTGTGAAACCCAGCGGCCAT	92	100	7	CTCGAGGACAGTTCAT
MYH7	G741R	W7	ACGTTTGATGTCCCTGAGGACAGTCAATG	ACGTTTGATGTGTGATCAATGTTCAGGGAG	91	100	9,33	TGAGCAGCTTCTGTGCC
MYH7	G741R	W5	ACGTTTGATGTCCCTGAGGACAGTCAATG	ACGTTTGATGTGTGATCAATGTTCAGGGAG	91	100	9,33	CTGAGCAGCTTCTGTGCC

Gen	Variante genética (cambio aminoácido)	Ensayo	Cebador i-PCR	Cebador 2- PCR	Tamaño amplicón (pb)	Concentración Cebadores PCR (nM)	Cebador reacción de Extensión	Concentración primer ext (µM)
MYH7	G741W	W10	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	91	100	AGTTCAATTGATGACGAG	9,33
MYH7	G741A	W19	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	91	100	ceetAGTTCATTGATGACAGGAAG	14
MYH7	A742G	W43	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	91	100	GGGAGCTGACGAGCTTCTCT	9,33
MYH7	E743D	W30	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	90	100	ceeeAGCAGAGGGGGCAGA	11,66
MYH7	G759V	W35	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	80	100	ceeeAGCAGAGGGGGCAGA	14
MYH7	F764L	W30	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	96	100	aeTTGATACACACCACTACAACTTTG	9,33
MYH7	G768R	W8	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	90	100	AACTTGTCTGACAGGTGT	7
MYH7	L769P	W33	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	99	100	ceTTTCTCCAGAGCCCAAG	9,33
MYH7	E774V	W1	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	89	100	GCCTTCCTGCTCCATTTTC	9,33
MYH7	D776G	W5	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	81	100	TGATGGGCTCAGGCTCTG	9,33
MYH7	D778V	W6	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	108	100	CTGGAGAAATGAGGG	7
MYH7	D778E	W4	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	80	100	ATGATCGGCTCAGGCTCTC	9,33
MYH7	E779X	W7	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	80	100	ATGGGCTCAGGCTCTC	7
MYH7	S782N	W17	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	81	100	ATACGCTGATGATGCGG	7
MYH7	S782R	W37	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	117	100	AGGACAGAGAGGCTGAG	7
MYH7	R787H	W8	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	92	100	CGGACTGTGGCTTGATA	7
MYH7	L786F	W13	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	105	100	TGTACTCATCTGGGA	9,33
MYH7	A797T	W14	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	89	100	GAGCTTTTGTACTCCATCTGG	14
MYH7	A797P	W16	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	89	100	teeeGCTTTTGTACTCCATCTGG	14
MYH7	M821L	W18	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	104	100	agTCCAGGGCCAAATCTTGACCCCA	14
MYH7	M822V	W21	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	91	100	ceCCAATCTTGACCCCA	7
MYH7	M822T	W24	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	97	100	GCCAAATCTTGACCCCA	7
MYH7	G822E	W27	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	97	100	ceetGAGCAATTCGGGCTTCATG	11,66
MYH7	V824I	W26	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	97	100	ttggaCATTCGGGCTTCATGGGG	14
MYH7	E846K	W4	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	93	100	CTTATGAGGGCCCATCTCTCT	11,66
MYH7	E846Q	W26	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	93	100	teetTTCATGGAGGCCATCTCTCT	14
MYH7	K847del	W29	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	96	100	ceesafTCTTTCATGGAGGCCATCTCT	14
MYH7	S851P	W6	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	90	100	TGTGAACTCTCTCTCATGG	9,33
MYH7	M852T	W7	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	100	100	AGAGAAGGAGGTGGCTTCA	9,33
MYH7	R856G	W39	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	120	100	TTCCTAGCGCTCTTTGAGGG	9,33
MYH7	K855R	W36	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	100	100	GCCCTCAAGAGGGCCCTAGAGA	11,66
MYH7	R889G	W37	ACGTTGGATGTGTGATCAATGTCCAGGAG	ACGTTGGATGCCCTTGAGGACAGATTCATG	87	100	ttgggtGCTGTAGAGGAAGTCCAGGCT	14

Estudio genético de la muerte súbita cardíaca: Miocardiopatía Hipertrófica Familiar y Síndrome de QT Largo.

Gen	Variante genética (cambio aminoácido)	Ensayo	Cebador 1-PCR	Cebador 2- PCR	Tamaño amplión (pb)	Concentración Cebadores PCR (nM)	Cebador reacción de Extensión	Concentración primer ext (µM)
MYH7	R89C	W6	ACGTTGGATGACGAGGGACACATCTTCTC	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	87	100	CCCTAGAGAAGTCCGAGGCT	9,33
MYH7	R89H	W28	ACGTTGGATGATCAAGCAGGGACCATCTTCTC	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	87	100	cAGAGAAGTCGGAGGCTC	7
MYH7	R870C	W30	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	87	100	ggaggctcctccagctcccttgc	9,33
MYH7	R870H	W4	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	87	100	CTTCTCTCCAGCTCCCTTG	9,33
MYH7	R870L	W8	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	87	100	ATCTCTCTCCAGCTCTTG	9,33
MYH7	M877K	W24	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	100	100	gahattctctctgacagggacacc	14
MYH7	M877L	W35	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	100	100	AAGGAGCTGGAGGAGAGAT	9,33
MYH7	V678A	W42	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	108	100	tsamGAGCTGGAGGAGAGAT	14
MYH7	Q882E	W26	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	103	100	ctcAGGTCAATCTTCTCT	7
MYH7	E668B3	W21	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	108	100	AGCTGCGAGTCACTTCT	7
MYH7	N755K	W23	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	105	100	GTGTCCCTCTGTCAGGGAAGA	11,66
MYH7	L889H	W41	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	90	100	gggTGAAGTGAAGTGCAGC	9,33
MYH7	V891A	W27	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	95	100	gggTGAAGTGAAGTGCAGC	9,33
MYH7	E884	W4	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	80	100	GCATCTGCCAGTGTCTGT	9,33
MYH7	A901P	W27	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	90	100	gATCACAGGCGCTCTCAG	7
MYH7	D986G	W20	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	91	100	aggTGTCTGAGGAGGCGCTGTG	9,33
MYH7	L989V	W5	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	86	100	TGAAGAGCGCTGTGATCAG	9,33
MYH7	I989V	W13	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	107	100	TCGAGCTGAATCTTGTGTTGA	11,66
MYH7	I989M	W35	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	107	100	hgccctccagctgaatctgtgtttt	14
MYH7	K766N	W29	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	107	100	CTGCAGGTGTCTTCAA	7
MYH7	K768N	W18	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	107	100	CTGCAGGTGTCTTCAA	7
MYH7	E921K	W1	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	99	100	TGGAGGCCAAGGTGAAG	7
MYH7	E924K	W3	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	99	100	CAAGGTGAAGAGATGAAC	11,66
MYH7	E927K	W17	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	97	100	cttcacatctctctctcattcct	9,33
MYH7	D928N	W23	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	106	100	tgagTCAAGCATCTCTCTCTCT	14
MYH7	S782D	W10	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	108	100	CTCGATACCGCTGATGATCGG	11,66
MYH7	S782D	W12	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	105	100	CTCGATACCGCTGATGATCGG	11,66
MYH7	E669B30	W31	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	107	100	tgagTCAAGCATCTCTCTCTCT	9,33
MYH7	E930K	W27	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	97	100	tgagTCAAGCATCTCTCTCTCT	9,33
MYH7	E930Q	W37	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	101	100	cttcTCAAGCATCTCTCTCT	9,33
MYH7	E931K	W22	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	106	100	ACGAGGCGCTCGAGGATGAG	11,66
MYH7	E935K	W42	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	ACGTTGGATGTCAAAGAGGGCGCTAGAGAG	86	100	tgagTCAAGCATCTCTCTCTCT	7

Estudio genético de la muerte súbita cardíaca: Miocardiopatía Hipertrófica Familiar y Síndrome de QT Largo.

Gen	Variante genética (cambio aminoácido)	Ensayo	Cebador 1-PCR	Cebador 2- PCR	Tamaño amplión (pb)	Concentración Cebadores PCR (nM)	Cebador reacción de Extensión	Concentración primer ext (µM)
MYH7	R1475C	W26	ACGTTGGATGAGCTGGAGTCTCTCCAGAG	ACGTTGGATGGCGTCTTGAGTTTGAAG	84	100	gTCTGTGCTGAGGAGC	7
MYH7	S1491C	W23	ACGTTGGATGACGACAGAGCTCTCAAC	ACGTTGGATGATTTGTTCTCCGGCTGAAG	99	100	ceetTCTCAGATGTTCCAGG	7
MYH7	R1500W	W30	ACGTTGGATGTCAMAGAACGCTATGAGGAG	ACGTTGGATGACACCCCTCGAGCTTTTG	95	100	ceetCAGGTTTGTGTTCTCC	9,933
MYH7	IVS32-25C_T	W33	ACGTTGGATGACCCAACTGCTCAGCTCAGC	ACGTTGGATGACCTCACTGAGCTCAGC	107	100	TGAGCTCAGCAGCCCTCAAA	9,933
MYH7	T1513S	W1	ACGTTGGATGGAGCTCAGTAGTGCTTTTC	ACGTTGGATGAACCCGAGTACCGTTTTC	107	100	CGAGCTCAGCAGCCCTCAAA	14
MYH7	E1558K	W11	ACGTTGGATGATCCCTCCCAACCCCTT	ACGTTGGATGGTGAATCTCAGCTGGCG	99	100	CCACACAGAGGAGATCTCGACTTGA	11,66
MYH7	K1617del	W17	ACGTTGGATGTGGAGCAGAGACAGCCAG	ACGTTGGATGGATCTTGAATCTCACTGAGG	101	100	GGTCTCTCTCATCTCTTCT	7
MYH7	R1634S	W19	ACGTTGGATGAGGCTCTTGACTTCTTCTG	ACGTTGGATGAGGAGACCTCAATGAGATGG	101	100	aCAGCTCAGCCAGCCAC	7
MYH7	A1683P	W5	ACGTTGGATGGGANTTGGAGTGTCTCTTC	ACGTTGGATGCTCTGATCTCTCAGCACAC	102	100	TTCAGCTGGAGGATGCACTGCTCT	11,66
MYH7	V1691M	W28	ACGTTGGATGCAACACCTCGAGGCTGAG	ACGTTGGATGTTCTCGGACCGCTCTGCT	86	100	gggAACCGCTCTCTCTCTCCACCA	14
MYH7	L1706P	W2	ACGTTGGATGTGGTGGAGCAGACAGAGCG	ACGTTGGATGAGCTTCTCTCACTCGGAATG	117	100	CCCGCTCACTAGTCTCAATC	9,933
MYH7	R1712W	W13	ACGTTGGATGAGCTTCTCTACCTGGGAATG	ACGTTGGATGGACAGGAGGACTGATTGAGAC	82	100	GGAGCTGATTGAGACTAGTGAG	11,66
MYH7	R1712Q	W24	ACGTTGGATGAGCTTCTCTACCTGGGAATG	ACGTTGGATGGACAGGAGGAACTTGGAC	82	100	gggATGATTGAGACTAGTGAGC	7
MYH7	E1428K	W13	ACGTTGGATGTTAATGCCAAGTGTCTCTCG	ACGTTGGATGATGGAGCGCTCTAGCTC	110	100	TCACCCATCAAGTCTCT	9,933
MYH7	IVS31+5	W15	ACGTTGGATGTCTCACTGAAACCCCTCATGC	ACGTTGGATGATCTCTGACCTCTCGACTG	107	100	GAGGAAGTTCGACAGGTGG	11,66
MYH7	K1729DEL	W41	ACGTTGGATGATCTCTGCACTCTGCACTG	ACGTTGGATGAGAACACCACTCATCAAC	115	100	GCCTCATCAACAGAGAGAGA	9,933
MYH7	S1735T	W34	ACGTTGGATGGCTCTCACTCAACAGAGAGAG	ACGTTGGATGATCTCTGACCTCTGCACTG	106	100	CAGTTTCACTTGGAGCTGG	11,66
MYH7	E1753K	W26	ACGTTGGATGTCCAGACTGAAGTGGAGGAG	ACGTTGGATGGGACTTACATCGGTGATGCG	102	100	caatGGCTTCTTGGCTTCTCTCT	14
MYH7	A1454T	W2	ACGTTGGATGACTGGAGACTCTCATATCTTC	ACGTTGGATGGCTGAAGAGTGAAGCTGTCT	89	100	GTGAGCTTGTCCCGGGGAGATCTTG	11,66
MYH7	E1768K	W29	ACGTTGGATGTCTCTCTCATGCGCTCAG	ACGTTGGATGATGTCCACCTCTCTCTCTG	117	100	gggAACCGCTATGATGGAGAG	9,933
MYH7	L1769M	W38	ACGTTGGATGTCTCTCTCATGCGCTCAG	ACGTTGGATGATGTGTGCGACCTCTCTCTG	117	100	gCGCAGATGGCAGAGGAG	9,933
MYH7	S1776G	W24	ACGTTGGATGTGTCTCTCTCATGCGCTCC	ACGTTGGATGTGTGCGAGAGAGCTGAG	86	100	gggAGAGAGGAGGAGGAGCC	7
MYH7	A1777T	W30	ACGTTGGATGTGTCTCTCTCATGCGCTCC	ACGTTGGATGTGTGCGAGAGAGCTGAG	86	100	gAGGAGCAGCACACAGC	11,66
MYH7	R1781H	W16	ACGTTGGATGGGTGCTTAAATGGTCTGTCTC	ACGTTGGATGGAGAGCTCAAGAGAGAG	101	100	ceetCACCAGCGCCCACTGGAGC	9,933
MYH7	IVS32+1	W31	ACGTTGGATGACATCTGGAGACTTCAAGC	ACGTTGGATGATGGGAACACTGGCAATGCG	115	100	agCTTGGGCCCCAGCACA	7
MYH7	K1838R	W35	ACGTTGGATGAGCTTGGAGAACTGAGTGGAG	ACGTTGGATGTAGTGAAGCTCTCTGATGTC	114	100	CTGGCTCTCTCTCATGCTCC	11,66
MYH7	R1845W	W17	ACGTTGGATGAGAACCGCAACCGAGAGTC	ACGTTGGATGATCTGGTAGTGAAGCTCTT	93	100	ctatGTGAGCTCTTGATGGCC	9,933
MYH7	T1854M	W2a	ACGTTGGATGCTACCTCTATAGCTGTGCTC	ACGTTGGATGGCAGAGGTTTCTGTGCTC	101	100	hgGTGTTTCTGTCTCTCTCC	11,66
MYH7	R1634W	W12	ACGTTGGATGAGGCTCTCTGACTTGTCTCTG	ACGTTGGATGAGGAGACCTCAATGAGATGG	101	100	cGATCCAGCTCAGCCAGCCCAAC	9,933
MYH7	H1901L	W4	ACGTTGGATGACACCAACTGTCTCAGAGTTC	ACGTTGGATGACCTTGTGACCTGGGACTC	111	100	TCCTCTGCTCTTCCAGCTCG	9,933
MYH7	I1912F	W33	ACGTTGGATGACAGCTTGTGAGCTGGGACT	ACGTTGGATGACCAACTGTGTCCAAAGTTC	112	100	GGCAGAGAGCGGGGGGAG	14
MYH7	T1929M	W9	ACGTTGGATGGAGTCCAGGTCACAG	ACGTTGGATGTACCAAGCCCAAGAGG	99	100	CAAGGCCCAAGAGGAGGCCACCTTC	

Gen	Variante genética (cambio aminoácido)	Ensayo	Cebador 1-PCR	Cebador 2- PCR	Tamaño amplicón (pb)	Concentración Cebadores PCR (nM)	Cebador reacción de Extensión	Concentración primer ext (µM)
MYH7	G1931-E1935del	W5	ACGTTGGATGTCACAGGACGTATGGAC	ACGTTGGATGAGCAGATCAAGATGTGGC	100	100	AGATCTGGCAAGCTACT	7
MYH7	Gdel10	W27	ACGTTGGATGTCTAGCGCTCTCTCTCTG	ACGTTGGATGATCGAGATTTGGAGATG	97	100	ggggATTCGGAGATGGGAGTCTTTG	14
MYH7	A26V	W12	ACGTTGGATGACCTGGCGAAGTCAAGAG	ACGTTGGATGCTCTTTTGAGGTCAAAAGGC	83	100	gGAGTCAAAAGGCTGTGCTGC	14
MYH7	V39M	W1	ACGTTGGATGGCCCTTTTGACCTCAAGAAG	ACGTTGGATGCGATCTTGGCTCTGCAAAAC	89	100	TTGTTGTCAACAGCA	7
MYH7	R54X	W4	ACGTTGGATGAGAGATTGTGCAAGGCCAAG	ACGTTGGATGATCTGGTCTGGCGCATGGA	85	100	ACTTTGCCACCTCTC	7
MYH7	R94L	W33	ACGTTGGATGAGGAGTTTGTCAAGGCCAAG	ACGTTGGATGACAGACCTTCCCATATCTC	99	100	TGCGCAGTACTTTGCAACCCTCT	11,66
MYH7	V59I	W3	ACGTTGGATGTCAGAGCCAGATGTGTCT	ACGTTGGATGTGACACCACTTCCCATAC	92	100	TACTCTGCTCGCAGTGA	9,33
MYH7	W31	W31	ACGTTGGATGCAAGACAGAGATCCCAAG	ACGTTGGATGACACCTCAAGAGCGCTAC	100	100	ACGGCTCTCGATGATC	7
MYH7	I/S44-24G_A	W32	ACGTTGGATGACATGGATGGAGCAGAAC	ACGTTGGATGTCTGGATGATCACTGTGAG	90	100	CTTGCCCTTGGCCCTAC	7
MYH7	T124I	W23	ACGTTGGATGACACCGGCAGCCACTGTGA	ACGTTGGATGTCTTTTAATCCCAAGACC	92	100	aghdGGGCTCTTCTGTCTCA	9,33
MYH7	R143Q	W30	ACGTTGGATGGTGTAGACTCTCTGAGTGTGT	ACGTTGGATGTCGGAGATGGAGAAAGTGT	100	100	chdGCTCTCTCTTGGCCC	7
MYH7	R146E	W3	ACGTTGGATGGTGTACACTCTCTGAGGTGGT	ACGTTGGATGGAGAGATGTGGGGCGGG	92	100	GCCTCTCTCTTGGCCC	7
MYH7	K148E	W38	ACGTTGGATGTGGAGATGAGAGAAATGTG	ACGTTGGATGTGTAGACTCTCTGAGGTGGT	100	100	ctthGTGGCTGCTACCCGGGCAAG	14
MYH7	K148N	W27	ACGTTGGATGTGTACACTCTCTGAGGTGGT	ACGTTGGATGTGGAGATGAGAGAAATGTG	100	100	ttgtTGGGGCGGGGCTCGCTCTCT	14
MYH7	S148I	W19	ACGTTGGATGTGGAGATGAGAGAAATGTG	ACGTTGGATGTGTAGACTCTCTGAGGTGGT	100	100	actdTAACGGGGCAGAGAGAGGA	11,66
MYH7	Y182C	W26	ACGTTGGATGAGACCTTCCAGGGCTCTCTC	ACGTTGGATGACATCTTCTCATCTCCGAC	87	100	actTCTCTCTCCATCTCGACAAAGGCT	14
MYH7	V186L	W3	ACGTTGGATGCAATAGACCCCTGTCTTCTAC	ACGTTGGATGAGCAAAAGTACTGGATGCC	100	100	GACCTCTTGGCTGTGA	7
MYH7	N187K	W25	ACGTTGGATGTGTCTTCAACAGCGAGAAATC	ACGTTGGATGAGCAAAAGTACTGGATGCC	90	100	aaTGGATGAGCCCTTTGGT	7
MYH7	T188N	W8	ACGTTGGATGTGGCTGCATAACAGCAAAAG	ACGTTGGATGAGATCCGAGGAGGAGAGA	88	100	CGGAGCAGGAGAGACAGTCAACA	11,66
MYH7	R190T	W1	ACGTTGGATGGAGCAGGAGAGACAGTCAAC	ACGTTGGATGTGGCTGCATTAACAGCAAG	80	100	GCAAGTACTGTGATGAC	7
MYH7	Y194S	W16	ACGTTGGATGGGAGACAGTCAACACCAAG	ACGTTGGATGTCCCAATGGCTGTGATATAC	81	100	GCTGCAATACAGCAAG	7
MYH7	A196T	W4	ACGTTGGATGGAGACAGTCAACACCAAG	ACGTTGGATGTCTTCTGGCTGCCCAAT	93	100	AATGGCTGTCAATACAG	7
MYH7	R204H	W6	ACGTTGGATGGAGGTCATCCAGTCTTG	ACGTTGGATGTGGCGGGCTCTGTGCTCT	92	100	CTGTGCTCTTCTTGTGTG	7
MYH7	K208DEL	W33	ACGTTGGATGTCTGGGTACAGAGACTGTG	ACGTTGGATGTGTATTTGAGCACTATGGG	109	100	cGCCATTGGGGACCCGACGAG	11,66
MYH7	P211L	W1	ACGTTGGATGTCTGGGTACAGAGACTGTG	ACGTTGGATGTGGGACCCGACGCAAGA	95	100	AAGAAAGACCCAGAGCC	7
MYH7	Q222K	W22	ACGTTGGATGTGGCAATGGCAAAAGGCTCTC	ACGTTGGATGTCTGGCCCTTCGAGGGGAC	97	100	ahGGCACTGTGGAGACCAATATCCAG	14
MYH7	A223T	W30	ACGTTGGATGTGGCAATGGCAAAAGGCTCTC	ACGTTGGATGTCTGGCCCTTCGAGGGGAC	97	100	ghTGGAGACCAAGATATCCAG	11,66
MYH7	L227V	W1	ACGTTGGATGGTGTGGCATTCGCCAAAG	ACGTTGGATGTGGAGGACAGATCATTCGAG	80	100	ATCCAGGCCAACCTGCT	7
MYH7	N225S	W27	ACGTTGGATGACAAAGCGGAGGAGTGTGTC	ACGTTGGATGATCATCCAGGCCCAAC	100	100	TCTGGAGGCTTTGGCA	7
MYH7	A235S	W38	ACGTTGGATGACAAAGCGGAGGAGTGTGTC	ACGTTGGATGATCATCCAGGCCCAAC	102	100	TGGAGGCTTTGGCAAT	7
MYH7	R243H	W35	ACGTTGGATGTCTTCCACCAAGTCAAGTCTC	ACGTTGGATGTGTGGCAATGGCAAGACCG	113	100	ctTCCGGAGCAGACTCTCTCC	11,66
MYH7	F244L	W1	ACGTTGGATGTCTTCCACCAAGTCAAGTCTC	ACGTTGGATGTGTGGCAATGGCAAGACCG	113	100	CGAGAACTCTCTCCCGC	7

Estudio genético de la muerte súbita cardíaca: Miocardiopatía Hipertrófica Familiar y Síndrome de QT Largo.

Gen	Variante genética (cambio aminoácido)	Ensayo	Cebador 1-PCR	Cebador 2- PCR	Tamaño amplicón (pb)	Concentración Cebadores PCR (nM)	Cebador reacción de Extensión	Concentración primer ext (µM)
MYH7	K246Q	W1	ACGTTGGATGTTCTCTGTGCCCCAAATG	ACGTTGGATGACTCATCACCACTCTCTCC	86	100	TCCTCTCCATCTCTAGGG	9,33
MYH7	R249Q	W4	ACGTTGGATGTGCGAGATGCCAATTTCTCTG	ACGTTGGATGACTCATCACCACTCTCTCTCC	99	100	CATCTCTAGGGGAAATTCATTC	11,66
MYH7	G256E	W7	ACGTTGGATGCTTAGGGGAAATTCATTTG	ACGTTGGATGACTCATCACCACTCTCTCTCC	97	100	CTCTATGCTGCGAGTCCCACTTT	14
MYH7	I261T	W3	ACGTTGGATGTGACGCTAGCAGATTCATGG	ACGTTGGATGAGTCCACAGGAAGTTGACATC	84	100	TGTCGATCATCTCGACACA	9,33
MYH7	I263T-I263M	W16	ACGTTGGATGTCACACAGAAAGTTGGCATC	ACGTTGGATGAGCTTACAGACATTCATGG	84	100	ATGGTGATCTCGACATC	7
MYH7	I263M	W1	ACGTTGGATGTGACGCTAGCAGATTCATGG	ACGTTGGATGAGCTTACAGATTCATGG	84	100	AAGTTGGATCTGCGACAT	9,33
MYH7	I143W	W9	ACGTTGGATGTGCGACATGCGAGAGATGG	ACGTTGGATGCTCTGCTCTTCAGCTGG	100	100	GAGGTGGTGGCTGCTCTAC	9,33
MYH7	K270R	W36	ACGTTGGATGCTCTCTGCTCTTCAGCTGG	ACGTTGGATGTTCTCTCTCTCTCTCTCC	101	100	CACGAGATCTCTGGAAA	7
MYH7	IVS10-17G_A	W34	ACGTTGGATGACAAAAGCTGAGTCTGCTG	ACGTTGGATGAGCAAGGACAGTGCATGAG	93	100	atTTGATGAGATAGTTGGTCTCAGT	14
MYH7	IVS10-28A_C	W32	ACGTTGGATGACAAAAGCTGAGTCTGCTG	ACGTTGGATGAGCAAGGACAGTGCATGAG	101	100	AAGCAAGGACAGTGCATGAGATAG	14
MYH7	F312C	W6	ACGTTGGATGTGATCCACCAACAACCTCTAC	ACGTTGGATGCTCTCAGCTGCATCAATGG	100	100	GGTCTCTCTTGGGAGATG	9,33
MYH7	V320M	W24	ACGTTGGATGATGAGCTCTCTCAGGCTCATC	ACGTTGGATGACCCCTTAGGATATGATTC	93	100	eatggCCCAAGGAGAGACACC	9,33
MYH7	A328P	W1	ACGTTGGATGTTTCATCTCTCCAAAGGAGAC	ACGTTGGATGTGACAGACATCAATCAGTGG	98	100	TCAGTGGCATGAGGCTCTCAG	11,66
MYH7	E328G	W3	ACGTTGGATGACCGTGGCTCTCATTTGATGA	ACGTTGGATGTCTCTCACACACTCAATCAG	80	100	CTCAGATCAGTGGCATGAGC	11,66
MYH7	I261T	W15	ACGTTGGATGGCTCTGGTCTCTCTTCTGCTG	ACGTTGGATGACAGACATCAACAACAGAGG	100	100	GTACTTCTCTGTTATTGGAGCCA	14
MYH7	K207Q	W13	ACGTTGGATGTTCTGGGTACAGGAACTTGG	ACGTTGGATGCTGTATTTGAGCAATTTGGG	110	100	gaAGCCATTGGGGAGCCCGAGCAAG	14
MYH7	IVS8-5	W10	ACGTTGGATGCTTTTGGCAATGCGCAAGCG	ACGTTGGATGTTCTCTCAACCAGTCCAAGTC	113	100	AGTCCCAAGGCCAAGGTCAGCGACCA	14
MYH7	M349T	W3	ACGTTGGATGTTCCAAAGTGCATGATGGCG	ACGTTGGATGATGTGCTGGGCTTCATTTCA	92	100	CTTCAGAGGAGAAAACCTCCA	11,66
MYH7	K351E	W1	ACGTTGGATGTTCCAAAGTGCATGATGGCG	ACGTTGGATGTGGGCTTCATTTCAAGAGAG	86	100	GAGGAGAAAACCTCATGTTAT	9,33
MYH7	A355T	W24	ACGTTGGATGCGAGAGGAGAAAACCTCATGTT	ACGTTGGATGCTGCTTCAGCTTGAAGTTC	98	100	atggTCCAAAGTGCATGATGG	11,66
MYH7	D382Y	W37	ACGTTGGATGAGAGTCACTCTTACCAAC	ACGTTGGATGAGTTCAGCCCATGAGGTAG	100	100	gTGAGGTAGGCAAGCTTGT	9,33
MYH7	K383N	W6	ACGTTGGATGCTGAGTTCAGCCCATGAG	ACGTTGGATGTGCTTCTGCTTTCTCTCTCC	81	100	TTCCAGAGGCTGACAA	7
MYH7	A385V	W5	ACGTTGGATGTGACACGGTGGCTGAGTT	ACGTTGGATGTGCTCTGCTTTCTCTCTCC	94	100	AGAGGCTGACAAAGTCTGG	7
MYH7	M388T	W4	ACGTTGGATGACTTTTCAACCAGGCTGAGC	ACGTTGGATGTTTTCCTCTCAGAGGCTGAC	112	100	AAGTCTGGCTACTCA	7
MYH7	G388E	W24	ACGTTGGATGTGAGCAGCGTGGCTGAG	ACGTTGGATGTGCTTGGCTTCTCTCTCTCC	95	100	ctctaaAGTCTGGCTTACTCTATGG	11,66
MYH7	L390V	W39	ACGTTGGATGCTGACAAAGTCTGCTCACTC	ACGTTGGATGACTCATTCGCCCACTTCAAC	107	100	GACAGGCTGGCTGATTT	7
MYH7	L390V	W21	ACGTTGGATGAGCGTGACAGTCTGGCTTAC	ACGTTGGATGTGGCAGCGCCCTTTGAGAC	85	100	gCCTTGAGCAGCGGTGGGCTGAGTT	11,66
MYH7	A393T	W31	ACGTTGGATGACTCAATGCCCACTTTCAACC	ACGTTGGATGATGCTTGGCTTACTCATGAGG	103	100	ctgaatTACTCATGGGCTGAACCTCA	14
MYH7	D394E	W14	ACGTTGGATGAGCTGCTGACTCATGAGGG	ACGTTGGATGTTGGTGAAGTACTCATTTGCC	113	100	atGCACAGGCCCTTGGAGCAG	9,33
MYH7	G398E	W36	ACGTTGGATGACTCAATGCCCACTTTCAACC	ACGTTGGATGAGTCTGGCTTACTCATGAGG	102	100	TGAATCTAGCTGAGCTGCTCAAGG	11,66
MYH7	R403W	W28	ACGTTGGATGAGCACTAGCCGAGCTGCTCAA	ACGTTGGATGCTTGGTGGTGAAGTACTCATTTG	90	100	taattGCCCACTTTCAACC	9,33
MYH7	R403Q	W6	ACGTTGGATGAGCACTAGCCGAGCTGCTCAA	ACGTTGGATGCTTGGTGGTGAAGTACTCATTTG	90	100	ATTGCCCACTTTCAACC	7

Gen	Variante genética (cambio aminoácido)	Ensayo	Cebador i-PCR	Cebador 2- PCR	Tamaño amplicón (pb)	Concentración Cebadores PCR (nM)	Cebador reacción de Extensión	Concentración primer ext (µM)
MYH7	R403L	W8	ACGTTGGATGAAGTCAAGCGGACCTGCTCAA	AGTTGGATGCCCTTGGTGAAGTCACTAATG	90	100	ATTGCCCACTTTCAAC	7
MYH7	V404fs	W14	ACGTTGGATGAAGTGTGCTACTCAATGGG	ACGTTGGATGTTGGTGAAGTACTCATGGC	113	100	ATTGCCCACTTTCAAC	7
MYH7	V404M	W26	ACGTTGGATGAAGTCAAGCGGACCTGCTCAA	ACGTTGGATGCTTGGTGAAGTACTCATG	90	100	CTCATGCCCACTTTCA	7
MYH7	V404L	W29	ACGTTGGATGAAGTCAAGCGGACCTGCTCAA	ACGTTGGATGCCCTTGGTGAAGTACTCATG	90	100	CTCATGCCCACTTTCA	7
MYH7	V404fs	W23	ACGTTGGATGAAGTGTGCTACTCAATGGG	ACGTTGGATGTGGTGAAGTACTCATGGC	113	100	ACTCATGGCCACTTTCA	11,66
MYH7	V406M	W5	ACGTTGGATGTGTCTCAAGGGGCTGTGCA	ACGTTGGATGACATCTGCCCTTGGTGAC	87	100	TTGACGTACTCATTTGCCA	7
MYH7	G407V	W1	ACGTTGGATGACATCTGCCCTTGGTGAC	ACGTTGGATGAAGTGGGAAAGTGGGCAAT	100	100	ACCTCGGGTGAAGTGG	9,33
MYH7	V411L	W4	ACGTTGGATGCTCGGGTGGAAGTGGGCAAT	ACGTTGGATGATGCTGCAATATGGGCTCTC	86	100	CATCTGCCCTTGGTGA	7
MYH7	G425R	W4	ACGTTGGATGTCTCTCTACACTGGCTTG	ACGTTGGATGGACCTCCAGGGGCACTGTATG	100	100	GCAGGTGATATATGCCACT	9,33
MYH7	A428V	W3	ACGTTGGATGGCCCTTGCAGGTGGATATATG	ACGTTGGATGATGCCATCCAGTTGATATCC	93	100	TCTCATACACTGGCTTG	7
MYH7	M435T	W20	ACGTTGGATGCACTGGCAAGGCACTGTATG	ACGTTGGATGATGCCATCCAGTTGATATCC	87	100	cggtTCAACATCCAGTTGAAC	9,33
MYH7	F438Y	W34	ACGTTGGATGTCTCCAGGGTGGCATGTATG	ACGTTGGATGAGGTGTAATGCCACTGGG	110	100	ggcGAGTGTATGAGAGGATGT	9,33
MYH7	V440M	W25	ACGTTGGATGTCTATGAAATACTAGCGCTG	ACGTTGGATGAGGCACTGTATGAGAGGATG	109	100	ccgAGGATGTTCAACTGGATG	9,33
MYH7	R442C	W37	ACGTTGGATGTCTATGAAATACTAGCGCTG	ACGTTGGATGAGGCACTGTATGAGAGGATG	109	100	gCACTGGATGTTGAGGCC	14
MYH7	R442H	W13	ACGTTGGATGTACTGGCGTGGCTGCTTGCT	ACGTTGGATGAGGCACTGTATGAGAGGATG	99	100	GTTCAACTGGATGTTGAGCGCA	11,66
MYH7	I443T	W1	ACGTTGGATGTACTGGCGTGGCTGCTTGCT	ACGTTGGATGAGGCACTGTATGAGAGGATG	99	100	cahtCTCAATGCCACCTGGAGACC	11,66
MYH7	K460E	W18	ACGTTGGATGTGTCCAGGACTCTTATGAAG	ACGTTGGATGTTCAACTGGATGTTGAGCG	100	100	ggacTGCACCTGTGGAGACCA	11,66
MYH7	K460T	W28	ACGTTGGATGGGCACTCTTATGAAGTACTGG	ACGTTGGATGAGAGGATGTTCAACTGGATGG	100	100	ctctccCTCGAGACCAAGCAACCA	9,33
MYH7	R453C	W31	ACGTTGGATGTGCCAGGACTCTTATGAAG	ACGTTGGATGTGGTGAAGCGGCATCAATG	90	100	CCTGGAGACCAAGAGGCCAC	7
MYH7	R453H	W26	ACGTTGGATGTGCCAGGACTCTTATGAAG	ACGTTGGATGTGGTGAAGCGGCATCAATG	90	100	GGAGACCAAGAGGCCAC	7
MYH7	R453L	W24	ACGTTGGATGTGCCAGGACTCTTATGAAG	ACGTTGGATGTGGTGAAGCGGCATCAATG	85	100	TTGACAGCTCTGTCACTCA	11,66
MYH7	N478S	W21	ACGTTGGATGAGACTGTGCTGCAAGCTCTGG	ACGTTGGATGCCCTGCACTGTCAACAGCTTG	80	100	gggaTGCATCACTTCACCAAC	11,66
MYH7	E483K	W31	ACGTTGGATGTGTGGTGTGAAGAAGTGC	ACGTTGGATGTGAGCACTGTCACTCAAC	99	100	cggaTCAAGTCTTCAACCAAC	7
MYH7	M493L	W17	ACGTTGGATGTCTGTGTACTCTCTCTGCTC	ACGTTGGATGGCATCAACTTCAACCAAGAG	99	100	GTCTCTCAACCAACCA	7
MYH7	M493K	W28	ACGTTGGATGTCTGTGTACTCTCTCTGCTC	ACGTTGGATGGCATCAACTTCAACCAAGAG	99	100	CACATGTTTGTGCTGGA	9,33
MYH7	E497D	W25	ACGTTGGATGATGAAGTCTCACTCGATGCC	ACGTTGGATGTCCAGCACTTCTTCAACCAAC	99	100	CTCTCTCTGTACTCTCTC	14
MYH7	E499K	W41	ACGTTGGATGTGCAGCAGTCTTCTCAACAC	ACGTTGGATGATGAATGTCTCACTGTATGCC	99	100	ggaaCTCGATGCCCTCTCTTGTGAC	11,66
MYH7	E500A	W22	ACGTTGGATGTGCAGCAGTCTTCTCAACAC	ACGTTGGATGATGAATGTCTCACTGTATGCC	99	100	ctctccGATGCCCTCTCTTGT	7
MYH7	V501H	W30	ACGTTGGATGTGCAGCAGTCTTCTCAACAC	ACGTTGGATGATGAATGTCTCACTGTATGCC	104	100	ggctTCATGCCAAAGTCAA	14
MYH7	I511F	W19	ACGTTGGATGAGGAGGAGTACAGAGAGAG	ACGTTGGATGTCTGATGAGGTCAATGGAG	104	100	atGCTTCAGGTGCATGTGCCAAAGTCAA	11,66
MYH7	I511T	W21	ACGTTGGATGAGGAGGAGTACAGAGAGAG	ACGTTGGATGTCTGATGAGGTCAATGGAG	104	100	gggaTGTGGAATTCATTCGACT	
MYH7	F513C	W27	ACGTTGGATGTCAATGCAGGCTCTCAGCTC	ACGTTGGATGTCAATGCAGGAGGAGGCAATGC	86	100		

Gen	Variante genética (cambio aminoácido)	Ensayo	Cebador 1-PCR	Cebador 2- PCR	Tamaño amplicón (pb)	Concentración Cebadores PCR (nM)	Cebador reacción de Extensión	Concentración primer ext (µM)
PRKAG2	R302Q	W15	ACGTTGGATGTGTTTACTCTCCACAGTGGC	AGTTGGATGAAGGAGCTTCTGCTTTGG	82	100	CTTTGGTAGCCACAGGTGTCC	11,66
TCAP	E132Q	W38	ACGTTGGATGACACACCCATCCAGCTCTAG	ACGTTGGATGGGAGCTGCTTTGTGATCTC	120	100	TTTGTGATCTCAGCCACCT	7
TCAP	T137I	W18	ACGTTGGATGTGCTGACAGGCACCCACAGG	ACGTTGGATGTGGGTGCCAGTGTGTGGA	96	100	tggaaaggaggtggctgagatca	11,66
TCAP	R153H	W14	ACGTTGGATGAGGTGGCTGAGATCAACAAG	ACGTTGGATGTGCTTCTGGGACATGGAG	118	100	AGCGGGACAGGAGGCGA	7
TNNC1	L290Q	W25	ACGTTGGATGATCTCTATCACTCTGCCAG	ACGTTGGATGGAACACAGAGTTCAAGGCGAG	113	100	ggaggggttcacactcatgcatat	11,66
TNNC1	E89D	W41	ACGTTGGATGCAAGGTGATGAGGATCTGGG	ACGTTGGATGACCGCTGCTCCACCTCAT	99	100	aaahccttcgcacatcttcgtgc	14
TNNC1	D75Y	W22	ACGTTGGATGATGACCCGACACCATCATGAC	ACGTTGGATGCTGTGTAACGGCCATGCTG	102	100	gcggacagcggtggacttt	7
TNNC1	G195D	W16	ACGTTGGATGATGAGGAGCTCTGGGTGAAG	ACGTTGGATGTTCCACAGAGTCTCTGGAG	89	100	ggcttggagttcatgagg	9,33
TNN3	A2V	W22	ACGTTGGATGTGCCATTCCGGCGTGAGT	ACGTTGGATGCCAATCCCACTGCTCTTG	88	100	tggcatcaactcaccatcc	7
TNN3	R21C	W2	ACGTTGGATGTGGCATAAGCGCGTGGTGG	ACGTTGGATGTAGGGAACCTTGCCTGTGAC	85	100	ACGAGCCCAATCGA	7
TNN3	K58N	W2	ACGTTGGATGCGAGACTGTGCTGTCAGAT	ACGTTGGATGTGCTCTCGGGCGGCTCT	88	100	CTCTGCTCAGCTCTTG	7
TNN3	P82S	W11	ACGTTGGATGTGACTCGAGCTCCCGGAA	ACGTTGGATGAGAGAGGGGGCGGCTTGA	97	100	GAGCACCGCTGCAG	7
TNN3	K178del	W2	ACGTTGGATGTGAAGGAGTCCCTGGAAGT	ACGTTGGATGATCTCTTCTGGGCTTAG	112	100	CTCACCTTCGTGGTGTCTCTTC	11,66
TNN3	Q159R	W30	ACGTTGGATGACTTGCTCGAGGCTCAAG	ACGTTGGATGATGGAAGCAAGTACCCAC	101	100	AGATTGGAGATCTGAGTC	7
TNN3	R141Q	W10	ACGTTGGATGGCATCATGAGGATCTCGAGG	ACGTTGGATGAGATCTTTGACCTTGAAGC	95	100	ACCTTCGAGGCAAGTTTAAAG	11,66
TNN3	L144Q	W6	ACGTTGGATGAGATCTTTGAACTTCGAGGC	ACGTTGGATGGCAATGGAATCTGAGAG	95	100	CATCTGGAGAGATCTCTCACTTCGCG	14
TNN3	R145G	W2	ACGTTGGATGAGATCTTTGAACTTCGAGGC	ACGTTGGATGGCAATGGAATCTGAGAG	95	100	TGGCACTCGAGAGATCTCACTTCC	14
TNN3	R146W	W17	ACGTTGGATGAGATCTTTGAACTTCGAGGC	ACGTTGGATGGCAATGGAATCTGAGAG	95	100	ccctctgcagagatctcaactctcc	14
TNN3	A157V	W14	ACGTTGGATGAGGTCGAGGAGCTCTTAG	ACGTTGGATGAGGAGATCTGCAAGATG	89	100	aCAGATGCCATCATGAGG	9,33
TNN3	R162Q	W8	ACGTTGGATGAGTGAAGGATCTGCAAGATG	ACGTTGGATGTCTCTTCACTGCTTAG	119	100	GCCCGCAGGTCUAGGGAGCTCTTAGCC	11,66
TNN3	R162P	W13	ACGTTGGATGATGAGGATCTGCAAGATG	ACGTTGGATGTCTCTTCACTGCTTAG	119	100	ahGTCCAGGAGCTCTTAGCC	7
TNN3	S166F	W4	ACGTTGGATGTCTTCACTGCTCTTAG	ACGTTGGATGTGCAGATGCCATGATGCAGG	107	100	GCCTGGGGCTAAGGAGT	14
TNN3	A171T	W12	ACGTTGGATGTAGCCCACTCACTTCTC	ACGTTGGATGGCTCAAGAGTCTGCGA	98	100	TCCTTGGTGTCTCTCTTC	7
TNN3	K177del	W17	ACGTTGGATGTGAAGGAGTCCCTGGAAGT	ACGTTGGATGATCTCTTCTGGGCTTAG	112	100	ggagcctcactctctcgtggtgctct	14
TNN3	K178E	W31	ACGTTGGATGTGAAGGAGTCCCTGGAAGT	ACGTTGGATGATCTCTTCTGGGCTTAG	112	100	ccagttgaaagaaggagacaccgag	14
TNN3	Kdel83	W28	ACGTTGGATGATCTCTTCTGGGCTTAG	ACGTTGGATGATCTCTTCTGGGCTTAG	86	100	AGAGGAGGAGCACCGAG	7
TNN3	K183E	W10	ACGTTGGATGATCTCTTCTGGGCTTAG	ACGTTGGATGATCTCTTCTGGGCTTAG	86	100	AGAGGAGGAGCACCGAG	7
TNN3	L198P	W12	ACGTTGGATGAGCTTTTCTTGGGCGCTC	ACGTTGGATGTGCGCATCTCTCCAGAAAC	108	100	cCTCGGCAAGACATGATGACAC	14
TNN3	E202H	W3	ACGTTGGATGGGAGGCTCAGTCTCAAG	ACGTTGGATGGGAAGCAATGATGACATG	86	100	TGCACCTGTGGATGG	7
TNN3	R204H	W4	ACGTTGGATGGCAAGCAATGATGACATG	ACGTTGGATGGGAGCTGAGCTCTCAAC	86	100	GGCTCAGCTCTCAAACTTTTCTTG	11,66
TNN3	R186Q	W27	ACGTTGGATGATCAGTGGATGATGTTTC	ACGTTGGATGATCCCTAACTCTGATCATC	101	100	ctTGGCAATCTCCAGGAAACC	11,66
TNN3	D190H	W15	ACGTTGGATGATCAGTGGATGATGTTTC	ACGTTGGATGATCCCTAACTCTGATCATC	101	100	AAMCCGGGAGGTGGGA	7

Estudio genético de la muerte súbita cardíaca: Miocardiopatía Hipertrófica Familiar y Síndrome de QT Largo.

Gen	Variante genética (cambio aminoácido)	Ensayo	Cebador i-PCR	Cebador 2- PCR	Tamaño amplicón (pb)	Concentración Cebadores PCR (nM)	Concentración primer ext (µM)
TNNI3	D190G	W44	ACGTTGGATGCACTAGTCATCGATGTTTC	AGCTTGGATGCGCTTAACCTCTGACTATCG	100	100	11,66
TNNI3	R192H	W7	ACGTTGGATGTCGTGACTCATCTGCCATCTTC	ACGTTGGATGTCTATCCACTCATGTTGCATC	99	100	11,66
TNNI3	I195M	W43	ACGTTGGATGACATTTTCTTTCGGGGCCCTC	ACGTTGGATGCGCATCTCTCCAGGAAMAC	108	100	14
TNNI3	D196H	W2	ACGTTGGATGTCGCGCATCTCCAGAAAC	ACGTTGGATAACTTTTCTTCTGGGCTTC	108	100	9,33
TNNI3	S196G	W11	ACGTTGGATGAGACTGGCGGCAACATC	ACGTTGGATGGGAAGCTCAGCTCTCAAC	95	100	7
TNNI3	S199N	W20	ACGTTGGATGGAGCTGGCGCAACATC	ACGTTGGATGGGAAGCTCAGCTCTCAAC	95	100	11,66
TNNI3	G203S	W20	ACGTTGGATGTTATCTCTCAGCGCCCTCTC	ACGTTGGATGATTCGATCGCAGTGGTGA	120	100	7
TNNI3	G203S	W26	ACGTTGGATGGCAAGCAATCGATGGCACTG	ACGTTGGATGGGAAGCTCAGCTCTCAAC	86	100	11,66
TNNI3	G203R	W8	ACGTTGGATGGCAAGCAATCGATGGCACTG	ACGTTGGATGGGAAGCTCAGCTCTCAAC	86	100	14
TNNI3	R204C	W13	ACGTTGGATGGGAAGGCTCAGCTCTCAAC	ACGTTGGATGGCAAGCAATCGATGGCACTG	86	100	7
TNNI3	K206Q	W14	ACGTTGGATGGCAAGCAATCGATGGCACTG	ACGTTGGATGAGTGGAGCAGGAAGGCTCAG	94	100	11,66
TNNI2	R286C	W6	ACGTTGGATGGAGCGAGATCTTTGGTGAAG	ACGTTGGATGAAGACCCCGCGGAAGGCTAA	93	100	11,66
TNNI2	R286H	W10	ACGTTGGATGGCGGGAAGGCTAAAGTCA	ACGTTGGATGGAGGAGATCTTTGGTGAAG	87	100	9,33
TNNI2	K68Q	W32	ACGTTGGATGGGCCAATGGAGGAGTC	ACGTTGGATGATCATCATCTCTCTCTCTG	115	100	7
TNNI2	W287X	W12	ACGTTGGATGGCGGGAAGGCTAAAGTCA	ACGTTGGATGGAGGAGATCTTTGGTGAAG	86	100	9,33
TNNI2	K247R	W13	ACGTTGGATGTTGTGGCAGACGATCATAC	ACGTTGGATGCCCACTCATATTTCTCTG	99	100	14
TNNI2	R29W	W7	ACGTTGGATGTCGAGCGCGCGCGGCTCAC	ACGTTGGATGGCAACTCATTCAGGCTCTTC	89	100	14
TNNI2	S69F	W17	ACGTTGGATGGCTGATGCTGACTATTCCTC	ACGTTGGATGATCTTGGGAGGCAACAGTT	83	100	11,66
TNNI2	P77L	W22	ACGTTGGATGTCGCTGACTATTCCTCTCTC	ACGTTGGATGAAGTCCACTCTCTCTCATC	102	100	14
TNNI2	K78E	W33	ACGTTGGATGTCGCTGACTATTCCTCTCTC	ACGTTGGATGAAGTCCACTCTCTCTCATC	102	100	11,66
TNNI2	D86A	W20	ACGTTGGATGACACGACCCGCTTACATCAA	ACGTTGGATGGGTGCTCATATGCGCAACTTG	97	100	7
TNNI2	R92QL	W43	ACGTTGGATGTTGTGTGGCAGCTCTCTGAGC	ACGTTGGATGACTCATATTCAGGTCCTCTCC	99	100	9,33
TNNI2	R92W	W16	ACGTTGGATGTGACTCTTTTGAAGTGGAG	ACGTTGGATGATCATAGCTCTCTCTCATC	104	100	9,33
TNNI2	K97N	W13	ACGTTGGATGACAGGATCATCCGGAAG	ACGTTGGATGCTCTGTCTCAAAAGTAGGCC	98	100	11,66
TNNI2	F110L	W7	ACGTTGGATGGAAAGCACTGAATGATGTGC	ACGTTGGATGCTTTGGAGAAAGCACTCC	106	100	7
TNNI2	R113W	W25	ACGTTGGATGGAAAGCACTGAATGATGTGC	ACGTTGGATGCTTTGGAGAAAGCACTCC	106	100	14
TNNI2	K124N	W11	ACGTTGGATGAGAAATGTTAGTGGGGGAG	ACGTTGGATGACAGGAAGAAAGAGGAGAG	100	100	11,66
TNNI2	R84C	W4	ACGTTGGATGTCCACCCAGGACATCCAC	ACGTTGGATGAAGAGGCTCAATGAGCG	97	100	14
TNNI2	R94L	W8	ACGTTGGATGAAGATGAGGCTCATACAGC	ACGTTGGATGTCCATCCACAGACATCCAC	97	100	11,66
TNNI2	K253R	W6	ACGTTGGATGTCTTAACTTGGAGGAGAG	ACGTTGGATGCCCACTCATATTTCTCTG	87	100	9,33
TNNI2	R131W	W30	ACGTTGGATGGCTTTGCTCTCTCTCTTAG	ACGTTGGATGTCTTCCGCTCATCTCCGAT	96	100	7
TNNI2	R141W	W28	ACGTTGGATGTCTCTCTCTAGGAGAGAG	ACGTTGGATGACTCAGACCCAGCGGCTCT	116	100	7

Estudio genético de la muerte súbita cardíaca: Miocardiopatía Hipertrófica Familiar y Síndrome de QT Largo.

Gen	Variante genética (cambio aminoácido)	Ensayo	Cebador 1-PCR	Cebador 2- PCR	Tamaño amplificación (pb)	Concentración Cebadores PCR (nM)	Cebador reacción de Extensión	Concentración primer ext (pM)
TPM1	D175N	W10	ACGTTGGATGCGCGTAAAGCTGGTCATCAATT	ACGTTGGATGCGCTTACCCCTCTCTGAGAG	95	100	CCCTCTCTGCGACGTTCCAGGT	11,66
TPM1	E180G	W8	ACGTTGGATGCGCGCTTACCTCTCTGAGAG	ACGTTGGATGCGGTAAGCTGGTCATCAATTG	94	100	CGACCTGGGAACGTGCGAG	7
TPM1	E180V	W23	ACGTTGGATGCGCGTAAAGCTGGTCATCAATTG	ACGTTGGATGCGCTTACCTCTCTGAGAG	94	100	ggagctcgagagctcagcccccctcc	14
TPM1	L185R	W15	ACGTTGGATGACCCCAATTCGTGGCTTCT	ACGTTGGATGTCATCATTTGAGAGCGACTGT	112	100	GTGCAGAGAGGCGGCTGAGC	11,66
TPM1	E192K	W13	ACGTTGGATGGAGCTTCAAGTTGTTGTCAC	ACGTTGGATGTTCTGCTCTGTGATGCAAAAC	99	100	AAACATTAGCAAAATGTGCC	9,33
TPM1	M281T	W3	ACGTTGGATGAGTACAAAGCCATCAGCGAG	ACGTTGGATGAGCGAGCGAGGTGGATGAAC	101	100	GATGAACGTTTACATGGAAGTC	14
TTN	R740L	W9	ACGTTGGATGATGCTCAGCAGACACCATTTG	ACGTTGGATGTTCTGAGGCTGGACGTTGG	109	100	GGGAGGCTCAGCTACTCTTTTCGG	11,66
TTN	R894L	W18	ACGTTGGATGGGAGGCTCAGCTACTTTTG	ACGTTGGATGGAATCCTATGCTCAGCAGAC	97	100	ggcttttgg-agtaccggahttaaggaaac	14
TTN	A743V	W30	ACGTTGGATGATGCTCAGCAGACACCATTTG	ACGTTGGATGTTCTGAGGCTGGACGTTGG	109	100	gatgctcagctactaccttttgcg	9,33
TTN	I1449Ile	W29	ACGTTGGATGGGTGAGAGCTTTTCTTTTGG	ACGTTGGATGTCAGGCTTAAGCCCAAAAC	100	100	cACACGATGTGGCAGCAGAGAT	9,33
TTN	W830R	W21	ACGTTGGATGAGTGCCACATCTCTGGATAC	ACGTTGGATGGGAAGTCAATGGACMTTGG	101	100	agggttagtctcttccctgtacc	9,33
TTN	R2572Q	W30	ACGTTGGATGAACGTTCTCTAGTGTGGTAG	ACGTTGGATGGATCTTTGAGATGTGAGACC	99	100	cccccgagatgctgagaccagccggcc	14
TTN	V54M	W25	ACGTTGGATGTGTGATTGTTTCAAGTCTCTC	ACGTTGGATGTGATGTAACCTGGACTCAGC	83	100	CGAAAGGTGCAAAAGATAGA	7
TTN	S3799Y	W11	ACGTTGGATGTGCGAGATTGTACAGTCCAG	ACGTTGGATGGATGAACACTGGCTGTGTCTC	102	100	TTCAGGCATTAGATACTTCTTTTG	14
TTN	Q4053X	W17	ACGTTGGATGCCGCCAGACCAATCAATTGAG	ACGTTGGATGTAGAAAGAGGTCCCTTCCC	104	100	tgggtctcccttccctgtgtaccgtcct	14
TTN	S4417N	W16	ACGTTGGATGAACCTGTCAAGTTAGTGTGG	ACGTTGGATGGCGCCGACGTATACATCCAAAG	93	100	ctaacAGCTTCCATGAGTATGGCA	14

VIII. BIBLIOGRAFÍA.

1. de Vreede-Swagemakers, J.J., A.P. Gorgels, W.I. Dubois-Arbouw, et al., *Out-of-hospital cardiac arrest in the 1990's: a population-based study in the Maastricht area on incidence, characteristics and survival*. J Am Coll Cardiol, 1997. 30(6): p. 1500-5.
2. Oliva, A., R. Brugada, E. D'Aloja, et al., *State of the Art in Forensic Investigation of Sudden Cardiac Death*. Am J Forensic Med Pathol, 2010.
3. Moritz, A.R., N. Zamcheck, *Sudden and unexpected deaths of young soldiers; diseases responsible for such deaths during World War II*. Arch Pathol (Chic), 1946. 42(5): p. 459-94.
4. Kuller, L., A. Lilienfeld, R. Fisher, *Sudden and unexpected deaths in young adults. An epidemiological study*. JAMA, 1966. 198(3): p. 248-52.
5. Keeling, J.W., S.A. Knowles, *Sudden death in childhood and adolescence*. J Pathol, 1989. 159(3): p. 221-4.
6. Anderson, R.E., R.B. Hill, D.W. Broudy, C.R. Key, D. Pathak, *A population-based autopsy study of sudden, unexpected deaths from natural causes among persons 5 to 39 years old during a 12-year period*. Hum Pathol, 1994. 25(12): p. 1332-40.
7. Cohle, S.D., B.A. Sampson, *The negative autopsy: sudden cardiac death or other?* Cardiovasc Pathol, 2001. 10(5): p. 219-22.
8. Krous, H.F., J.B. Beckwith, R.W. Byard, et al., *Sudden infant death syndrome and unclassified sudden infant deaths: a definitional and diagnostic approach*. Pediatrics, 2004. 114(1): p. 234-8.
9. Bajanowski, T., B. Brinkmann, M. Vennemann, *The San Diego definition of SIDS: practical application and comparison with the GeSID classification*. Int J Legal Med, 2006. 120(6): p. 331-6.
10. Aguilera, B. *Anatomía patológica de la muerte súbita del lactante*. . in V Simposium Nacional Sobre Síndrome de la Muerte Súbita del Lactante (SMSL). Simposium satélite al 53 congreso de la Asociación Española de Pediatría. 2004.
11. Drory, Y., Y. Turetz, Y. Hiss, et al., *Sudden unexpected death in persons less than 40 years of age*. Am J Cardiol, 1991. 68(13): p. 1388-92.
12. Basso, C., F. Calabrese, D. Corrado, G. Thiene, *Postmortem diagnosis in sudden cardiac death victims: macroscopic, microscopic and molecular findings*. Cardiovasc Res, 2001. 50(2): p. 290-300.
13. Neuspiel, D.R., L.H. Kuller, *Sudden and unexpected natural death in childhood and adolescence*. JAMA, 1985. 254(10): p. 1321-5.
14. Topaz, O., J.E. Edwards, *Pathologic features of sudden death in children, adolescents, and young adults*. Chest, 1985. 87(4): p. 476-82.
15. van der Werf, C., I.M. van Langen, A.A. Wilde, *Sudden death in the young: what do we know about it and how to prevent?* Circ Arrhythm Electrophysiol, 2010. 3(1): p. 96-104.
16. Burke, A.P., A. Farb, R. Virmani, J. Goodin, J.E. Smialek, *Sports-related and non-sports-related sudden cardiac death in young adults*. Am Heart J, 1991. 121(2 Pt 1): p. 568-75.
17. Shen, W.K., W.D. Edwards, S.C. Hammill, et al., *Sudden unexpected nontraumatic death in 54 young adults: a 30-year population-based study*. Am J Cardiol, 1995. 76(3): p. 148-52.
18. Corrado, D., C. Basso, G. Thiene, *Sudden cardiac death in young people with apparently normal heart*. Cardiovasc Res, 2001. 50(2): p. 399-408.
19. Morentin, B., M.P. Suarez-Mier, B. Aguilera, *Sudden unexplained death among persons 1-35 years old*. Forensic Sci Int, 2003. 135(3): p. 213-7.
20. Maron, B.J., J. Shirani, L.C. Poliac, et al., *Sudden death in young competitive athletes. Clinical, demographic, and pathological profiles*. JAMA, 1996. 276(3): p. 199-204.
21. Puranik, R., C.K. Chow, J.A. Duflou, M.J. Kilborn, M.A. McGuire, *Sudden death in the young*. Heart Rhythm, 2005. 2(12): p. 1277-82.
22. Burke, V., *Sudden natural death*. Encyclopedia of forensic and legal medicine. 2005, Ox-

- ford UK. : Elsevier Ltd.
23. Morentin, B., M.P. Suarez-Mier, B. Aguilera, A. Bodegas, [Myocardial disease mortality in children and young adults. A population-based observational study]. *Rev Esp Cardiol*, 2006. 59(3): p. 238-46.
24. Adabag, A.S., R.V. Luepker, V.L. Roger, B.J. Gersh, *Sudden cardiac death: epidemiology and risk factors*. *Nat Rev Cardiol*, 2010.
25. Chugh, S.S., K. Reinier, C. Teodorescu, et al., *Epidemiology of sudden cardiac death: clinical and research implications*. *Prog Cardiovasc Dis*, 2008. 51(3): p. 213-28.
26. Chugh, S.S., J. Jui, K. Gunson, et al., *Current burden of sudden cardiac death: multiple source surveillance versus retrospective death certificate-based review in a large U.S. community*. *J Am Coll Cardiol*, 2004. 44(6): p. 1268-75.
27. Chugh, S.S., *Early identification of risk factors for sudden cardiac death*. *Nat Rev Cardiol*, 2010.
28. Myerburg, R.J., *Sudden cardiac death in persons with normal (or near normal) hearts*. *Am J Cardiol*, 1997. 79(6A): p. 3-9.
29. Aguilera, B., M.P. Suárez-Mier, *Muerte súbita cardíaca*. *E.J.Autopsy*, 2003. 1: p. 21-34.
30. Huikuri, H.V., A. Castellanos, R.J. Myerburg, *Sudden death due to cardiac arrhythmias*. *N Engl J Med*, 2001. 345(20): p. 1473-82.
31. Gorgels, A.P., C. Gijssbers, J. de Vreede-Swagemakers, A. Lousberg, H.J. Wellens, *Out-of-hospital cardiac arrest--the relevance of heart failure. The Maastricht Circulatory Arrest Registry*. *Eur Heart J*, 2003. 24(13): p. 1204-9.
32. Stecker, E.C., C. Vickers, J. Waltz, et al., *Population-based analysis of sudden cardiac death with and without left ventricular systolic dysfunction: two-year findings from the Oregon Sudden Unexpected Death Study*. *J Am Coll Cardiol*, 2006. 47(6): p. 1161-6.
33. Christiaans, I., K. van Engelen, I.M. van Langen, et al., *Risk stratification for sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy: systematic review of clinical risk markers*. *Europace*, 2010. 12(3): p. 313-21.
34. Davies, M.J., *Anatomic features in victims of sudden coronary death. Coronary artery pathology*. *Circulation*, 1992. 85(1 Suppl): p. I19-24.
35. Farb, A., A.L. Tang, A.P. Burke, et al., *Sudden coronary death. Frequency of active coronary lesions, inactive coronary lesions, and myocardial infarction*. *Circulation*, 1995. 92(7): p. 1701-9.
36. Chugh, S.S., K.L. Kelly, J.L. Titus, *Sudden cardiac death with apparently normal heart*. *Circulation*, 2000. 102(6): p. 649-54.
37. Adabag, A.S., B.J. Maron, E. Appelbaum, et al., *Occurrence and frequency of arrhythmias in hypertrophic cardiomyopathy in relation to delayed enhancement on cardiovascular magnetic resonance*. *J Am Coll Cardiol*, 2008. 51(14): p. 1369-74.
38. Richardson, P., W. McKenna, M. Bristow, et al., *Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies*. *Circulation*, 1996. 93(5): p. 841-2.
39. Maron, B.J., J.A. Towbin, G. Thiene, et al., *Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention*. *Circulation*, 2006. 113(14): p. 1807-16.
40. Elliott, P., B. Andersson, E. Arbustini, et al., *Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases*. *Eur Heart J*, 2008. 29(2): p. 270-6.
41. Morita, H., J. Seidman, C.E. Seidman, *Genetic causes of human heart failure*. *J Clin In-*

- vest, 2005. 115(3): p. 518-26.
42. Spirito, P., C.E. Seidman, W.J. McKenna, B.J. Maron, *The management of hypertrophic cardiomyopathy*. N Engl J Med, 1997. 336(11): p. 775-85.
43. Maron, B.J., J.M. Gardin, J.M. Flack, et al., *Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults*. Circulation, 1995. 92(4): p. 785-9.
44. Marian, A.J., *Hypertrophic cardiomyopathy: from genetics to treatment*. Eur J Clin Invest, 2010. 40(4): p. 360-9.
45. Maron, B.J., *Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review*. JAMA, 2002. 287(10): p. 1308-20.
46. Elliott, P., W.J. McKenna, *Hypertrophic cardiomyopathy*. Lancet, 2004. 363(9424): p. 1881-91.
47. Maron, B.J., A. Pelliccia, P. Spirito, *Cardiac disease in young trained athletes. Insights into methods for distinguishing athlete's heart from structural heart disease, with particular emphasis on hypertrophic cardiomyopathy*. Circulation, 1995. 91(5): p. 1596-601.
48. Sharma, S., P.M. Elliott, G. Whyte, et al., *Utility of metabolic exercise testing in distinguishing hypertrophic cardiomyopathy from physiologic left ventricular hypertrophy in athletes*. J Am Coll Cardiol, 2000. 36(3): p. 864-70.
49. Thiene, G., D. Corrado, C. Basso, *Cardiomyopathies: is it time for a molecular classification?* Eur Heart J, 2004. 25(20): p. 1772-5.
50. Chung, M.W., T. Tsoutsman, C. Semsarian, *Hypertrophic cardiomyopathy: from gene defect to clinical disease*. Cell Res, 2003. 13(1): p. 9-20.
51. Ingles, J., A. Doolan, C. Chiu, et al., *Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counselling*. J Med Genet, 2005. 42(10): p. e59.
52. Girolami, F., C.Y. Ho, C. Semsarian, et al., *Clinical features and outcome of hypertrophic cardiomyopathy associated with triple sarcomere protein gene mutations*. J Am Coll Cardiol, 2010. 55(14): p. 1444-53.
53. Maron, B.J., *Sudden Cardiac Death in Genetic Heart Diseases and the Promise of Prevention*. Rev Esp Cardiol, 2010. 63(3): p. 257-260.
54. Lipshultz, S.E., L.A. Sleeper, J.A. Towbin, et al., *The incidence of pediatric cardiomyopathy in two regions of the United States*. N Engl J Med, 2003. 348(17): p. 1647-55.
55. Arola, A., J. Tuominen, O. Ruuskanen, E. Jokinen, *Idiopathic dilated cardiomyopathy in children: prognostic indicators and outcome*. Pediatrics, 1998. 101(3 Pt 1): p. 369-76.
56. Towbin, J.A., N.E. Bowles, *The failing heart*. Nature, 2002. 415(6868): p. 227-33.
57. Monserrat, L., M. Hermida-Prieto, A. Castro-Beiras, *Avances en miocardiopatía dilatada idiopática: del genotipo al fenotipo clínico*. Rev Esp cardiol. Supl., 2007. 7: p. 2F-13F.
58. Hirota, Y., G. Shimizu, Y. Kita, et al., *Spectrum of restrictive cardiomyopathy: report of the national survey in Japan*. Am Heart J, 1990. 120(1): p. 188-94.
59. Mogensen, J., T. Kubo, M. Duque, et al., *Idiopathic restrictive cardiomyopathy is part of the clinical expression of cardiac troponin I mutations*. J Clin Invest, 2003. 111(2): p. 209-16.
60. Kushwaha, S.S., J.T. Fallon, V. Fuster, *Restrictive cardiomyopathy*. N Engl J Med, 1997. 336(4): p. 267-76.
61. Child, J.S., J.K. Perloff, *The restrictive cardiomyopathies*. Cardiol Clin, 1988. 6(2): p. 289-316.
62. Eriksson, P., K. Boman, B. Jacobsson, B.O. Olofsson, *Cardiac arrhythmias in familial amyloid polyneuropathy during anaesthesia*. Acta Anaesthesiol Scand, 1986. 30(4): p. 317-20.

63. Nakata, T., K. Shimamoto, S. Yonekura, et al., *Cardiac sympathetic denervation in trans-thyretin-related familial amyloidotic polyneuropathy: detection with iodine-123-MIBG*. J Nucl Med, 1995. 36(6): p. 1040-2.
64. Winters, S.L., M. Cohen, S. Greenberg, et al., *Sustained ventricular tachycardia associated with sarcoidosis: assessment of the underlying cardiac anatomy and the prospective utility of programmed ventricular stimulation, drug therapy and an implantable antitachycardia device*. J Am Coll Cardiol, 1991. 18(4): p. 937-43.
65. Oni, A.A., R.E. Hersherberger, D.J. Norman, et al., *Recurrence of sarcoidosis in a cardiac allograft: control with augmented corticosteroids*. J Heart Lung Transplant, 1992. 11(2 Pt 1): p. 367-9.
66. Thiene, G., A. Nava, D. Corrado, L. Rossi, N. Pennelli, *Right ventricular cardiomyopathy and sudden death in young people*. N Engl J Med, 1988. 318(3): p. 129-33.
67. McKenna, W.J., G. Thiene, A. Nava, et al., *Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Task Force of the Working Group Myocardial and Pericardial Disease of the European Society of Cardiology and of the Scientific Council on Cardiomyopathies of the International Society and Federation of Cardiology*. Br Heart J, 1994. 71(3): p. 215-8.
68. Corrado, D., C. Basso, G. Thiene, et al., *Spectrum of clinicopathologic manifestations of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: a multicenter study*. J Am Coll Cardiol, 1997. 30(6): p. 1512-20.
69. Bauce, B., A. Nava, G. Beffagna, et al., *Multiple mutations in desmosomal proteins encoding genes in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia*. Heart Rhythm, 2010. 7(1): p. 22-9.
70. Hughes, S.E., W.J. McKenna, *New insights into the pathology of inherited cardiomyopathy*. Heart, 2005. 91(2): p. 257-64.
71. Murphy, R.T., R. Thaman, J.G. Blanes, et al., *Natural history and familial characteristics of isolated left ventricular non-compaction*. Eur Heart J, 2005. 26(2): p. 187-92.
72. Monserrat, L., M. Hermida-Prieto, X. Fernandez, et al., *Mutation in the alpha-cardiac actin gene associated with apical hypertrophic cardiomyopathy, left ventricular non-compaction, and septal defects*. Eur Heart J, 2007. 28(16): p. 1953-61.
73. Ichida, F., Y. Hamamichi, T. Miyawaki, et al., *Clinical features of isolated noncompaction of the ventricular myocardium: long-term clinical course, hemodynamic properties, and genetic background*. J Am Coll Cardiol, 1999. 34(1): p. 233-40.
74. Monserrat, L., *Miocardiopatía no compactada: una enfermedad en busca de criterios*. Rev Esp Cardiol., 2008. 61 (2): p. 112-5.
75. Monserrat, L., R. Barriales-Villa, M. Hermida-Prieto, *Apical hypertrophic cardiomyopathy and left ventricular non-compaction: two faces of the same disease*. Heart, 2008. 94(10): p. 1253.
76. Berne, R.M., M.N. Levy, *Fisiología*, ed. E.H. ed. 2001.
77. Schimpf, R., M. Borggreffe, C. Wolpert, *Clinical and molecular genetics of the short QT syndrome*. Curr Opin Cardiol, 2008. 23(3): p. 192-8.
78. Brugada, J., R. Brugada, P. Brugada, *Channelopathies: a new category of diseases causing sudden death*. Herz, 2007. 32(3): p. 185-91.
79. Towbin, J.A., *Molecular genetic basis of sudden cardiac death*. Pediatr Clin North Am, 2004. 51(5): p. 1229-55.
80. Zhang, L., K.W. Timothy, G.M. Vincent, et al., *Spectrum of ST-T-wave patterns and repolarization parameters in congenital long-QT syndrome: ECG findings identify genotypes*. Circulation, 2000. 102(23): p. 2849-55.
81. Hedley, P.L., P. Jorgensen, S. Schlamowitz, et al., *The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a mutation update*. Hum Mutat, 2009. 30(11): p. 1486-511.

82. Napolitano, C., S.G. Priori, P.J. Schwartz, et al., *Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice*. JAMA, 2005. 294(23): p. 2975-80.
83. Priori, S.G., C. Napolitano, P.J. Schwartz, *Low penetrance in the long-QT syndrome: clinical impact*. Circulation, 1999. 99(4): p. 529-33.
84. Vincent, G.M., K.W. Timothy, M. Leppert, M. Keating, *The spectrum of symptoms and QT intervals in carriers of the gene for the long-QT syndrome*. N Engl J Med, 1992. 327(12): p. 846-52.
85. Goldenberg, I., A.J. Moss, *Long QT syndrome*. J Am Coll Cardiol, 2008. 51(24): p. 2291-300.
86. Fuster, O.R., Walsh, Poole-Wilson, KingIII, Roberts,Nash, Prystowsky., *Hurst's the heart.12th edition*. 2008: McGraw Hill.
87. Bogdanov, D., *Starvation diets as a cause of acquired Long QT Syndrome*. Annals of Internal Medicine. Letters., 2009. 150(7): p. 501.
88. Dritsas, A., E. Sbarouni, D. Gilligan, P. Nihoyannopoulos, C.M. Oakley, *QT-interval abnormalities in hypertrophic cardiomyopathy*. Clin Cardiol, 1992. 15(10): p. 739-42.
89. Fei, L., A.K. Slade, A.A. Grace, et al., *Ambulatory assessment of the QT interval in patients with hypertrophic cardiomyopathy: risk stratification and effect of low dose amiodarone*. Pacing Clin Electrophysiol, 1994. 17(11 Pt 2): p. 2222-7.
90. Bazzet, H., *An analysis of the time relationship of electrocardiograms*. Heart, 1920. 7: p. 353-370.
91. Zareba, W., I. Cygankiewicz, *Long QT syndrome and short QT syndrome*. Prog Cardiovasc Dis, 2008. 51(3): p. 264-78.
92. Schwartz, P.J., A.J. Moss, G.M. Vincent, R.S. Crampton, *Diagnostic criteria for the long QT syndrome. An update*. Circulation, 1993. 88(2): p. 782-4.
93. Hofman, N., A.A. Wilde, S. Kaab, et al., *Diagnostic criteria for congenital long QT syndrome in the era of molecular genetics: do we need a scoring system?* Eur Heart J, 2007. 28(5): p. 575-80.
94. Gussak, I., P. Brugada, J. Brugada, et al., *Idiopathic short QT interval: a new clinical syndrome?* Cardiology, 2000. 94(2): p. 99-102.
95. Gaita, F., C. Giustetto, F. Bianchi, et al., *Short QT Syndrome: a familial cause of sudden death*. Circulation, 2003. 108(8): p. 965-70.
96. Anttonen, O., M.J. Junttila, H. Rissanen, et al., *Prevalence and prognostic significance of short QT interval in a middle-aged Finnish population*. Circulation, 2007. 116(7): p. 714-20.
97. Brugada, R., K. Hong, R. Dumaine, et al., *Sudden death associated with short-QT syndrome linked to mutations in HERG*. Circulation, 2004. 109(1): p. 30-5.
98. Papavassiliu, T., C. Wolpert, S. Fluchter, et al., *Magnetic resonance imaging findings in patients with Brugada syndrome*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2004. 15(10): p. 1133-8.
99. Frustaci, A., M.A. Russo, C. Chimenti, *Structural myocardial abnormalities in asymptomatic family members with Brugada syndrome and SCN5A gene mutation*. Eur Heart J, 2009. 30(14): p. 1763.
100. Hermida, J.S., J.L. Lemoine, F.B. Aoun, et al., *Prevalence of the brugada syndrome in an apparently healthy population*. Am J Cardiol, 2000. 86(1): p. 91-4.
101. Hata, Y., N. Chiba, K. Hotta, *Incidence and clinical significance of right bundle branch block and ST segment elevation in V1-V3 in 6-to 18-year-old school children in Japan [abstract]*. Circulation, 1997. 20(Supl).
102. Campuzano, O., P. Beltran-Alvarez, A. Iglesias, et al., *Genetics and cardiac channelopathies*. Genet Med, 2010. 12(5): p. 260-7.
103. Hedley, P.L., P. Jorgensen, S. Schlamowitz, et al., *The genetic basis of Brugada syndrome:*

- a mutation update. Hum Mutat, 2009. 30(9): p. 1256-66.
104. Chen, Q., G.E. Kirsch, D. Zhang, et al., *Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation*. Nature, 1998. 392(6673): p. 293-6.
105. Antzelevitch, C., G.D. Pollevick, J.M. Cordeiro, et al., *Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death*. Circulation, 2007. 115(4): p. 442-9.
106. Antzelevitch, C., P. Brugada, J. Brugada, et al., *Brugada syndrome: 1992-2002: a historical perspective*. J Am Coll Cardiol, 2003. 41(10): p. 1665-71.
107. Schott, J.J., C. Alshinawi, F. Kyndt, et al., *Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A*. Nat Genet, 1999. 23(1): p. 20-1.
108. Dumaine, R., J.A. Towbin, P. Brugada, et al., *Ionic mechanisms responsible for the electrocardiographic phenotype of the Brugada syndrome are temperature dependent*. Circ Res, 1999. 85(9): p. 803-9.
109. Veldkamp, M.W., P.C. Viswanathan, C. Bezzina, et al., *Two distinct congenital arrhythmias evoked by a multidysfunctional Na(+) channel*. Circ Res, 2000. 86(9): p. E91-7.
110. Wang, D.W., N. Makita, A. Kitabatake, J.R. Balser, A.L. George, Jr., *Enhanced Na(+) channel intermediate inactivation in Brugada syndrome*. Circ Res, 2000. 87(8): p. E37-43.
111. Rivolta, I., H. Abriel, M. Tateyama, et al., *Inherited Brugada and long QT-3 syndrome mutations of a single residue of the cardiac sodium channel confer distinct channel and clinical phenotypes*. J Biol Chem, 2001. 276(33): p. 30623-30.
112. Clancy, C.E., Y. Rudy, *Na(+) channel mutation that causes both Brugada and long-QT syndrome phenotypes: a simulation study of mechanism*. Circulation, 2002. 105(10): p. 1208-13.
113. Grant, A.O., M.P. Carboni, V. Neplioueva, et al., *Long QT syndrome, Brugada syndrome, and conduction system disease are linked to a single sodium channel mutation*. J Clin Invest, 2002. 110(8): p. 1201-9.
114. Vatta, M., R. Dumaine, G. Varghese, et al., *Genetic and biophysical basis of sudden unexplained nocturnal death syndrome (SUNDS), a disease allelic to Brugada syndrome*. Hum Mol Genet, 2002. 11(3): p. 337-45.
115. Allegue, C., R. Gil, P. Sanchez-Diz, et al., *A new approach to long QT syndrome mutation detection by Sequenom MassARRAY system*. Electrophoresis, 2010. 31(10): p. 1648-55.
116. Coumel, P., J. Fidelle, V. Lucet, P. Attuel, Y. Bouvrain, *Catecholamine-induced severe ventricular arrhythmias with Adams-Stokes syndrome in children: report of four cases*. Br Heart J, 1978. 40(suppl) p. 28-37.
117. Priori, S.G., C. Napolitano, N. Tiso, et al., *Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia*. Circulation, 2001. 103(2): p. 196-200.
118. Cerrone, M., B. Colombi, R. Bloise, et al., *Clinical and molecular characterization of a large cohort of patients affected with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia*. Circulation, 2004. 110 (supl. II): p. 552-553.
119. Tester, D.J., E. Carturan, M. Dura, et al., *Molecular and functional characterization of novel RyR2-encoded cardiac ryanodine receptor/calcium release channel mutations in sudden infant death syndrome* Heart Rhythm, 2006. 3 (Supl.I).
120. Choi, G., L.J. Kopplin, D.J. Tester, et al., *Spectrum and frequency of cardiac channel defects in swimming-triggered arrhythmia syndromes*. Circulation, 2004. 110(15): p. 2119-24.
121. Mathews, T.J., F. Menacker, M.F. MacDorman, *Infant mortality statistics from the 2002 period: linked birth/infant death data set*. Natl Vital Stat Rep, 2004. 53(10): p. 1-29.
122. Hoyert, D.L., M.P. Heron, S.L. Murphy, H.C. Kung, *Deaths: final data for 2003*. Natl Vital

- Stat Rep, 2006. 54(13): p. 1-120.
123. Asociación Española de Pediatría, Grupo de Trabajo para el Estudio y Prevención de la Muerte Súbita Infantil de la Asociación Española de Pediatría. *Libro Blanco de la Muerte Súbita del Lactante*. 2003: Ediciones Ergon.
 124. Hofman, N., H.L. Tan, S.A. Clur, et al., *Contribution of inherited heart disease to sudden cardiac death in childhood*. Pediatrics, 2007. 120(4): p. e967-73.
 125. Viskin, S., *Antagonist: routine screening of all athletes prior to participation in competitive sports should be mandatory to prevent sudden cardiac death*. Heart Rhythm, 2007. 4(4): p. 525-8.
 126. Corrado, D., G. Thiene, *Protagonist: routine screening of all athletes prior to participation in competitive sports should be mandatory to prevent sudden cardiac death*. Heart Rhythm, 2007. 4(4): p. 520-4.
 127. Suarez-Mier, M.P., B. Aguilera, *[Causes of sudden death during sports activities in Spain]*. Rev Esp Cardiol, 2002. 55(4): p. 347-58.
 128. Jouven, X., M. Desnos, C. Guerot, P. Ducimetiere, *Predicting sudden death in the population: the Paris Prospective Study I*. Circulation, 1999. 99(15): p. 1978-83.
 129. Monserrat, L., Dumont, C.A., *Utilidad de la Genética en la Miocardiopatía Hipertrófica*. in *5to Congreso virtual de cardiología*. 2007.
 130. Van Spaendonck-Zwarts, K.Y., M.P. Van den Berg, J.P. Van Tintelen, *DNA analysis in inherited cardiomyopathies: current status and clinical relevance*. Pacing Clin Electrophysiol, 2008. 31 Suppl 1: p. S46-9.
 131. Olivotto, I., M.S. Maron, A.S. Adabag, et al., *Gender-related differences in the clinical presentation and outcome of hypertrophic cardiomyopathy*. J Am Coll Cardiol, 2005. 46(3): p. 480-7.
 132. McKenna, W.J., A.J. Camm, *Sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. Assessment of patients at high risk*. Circulation, 1989. 80(5): p. 1489-92.
 133. Shah, P.M., A.G. Adelman, E.D. Wigle, et al., *The natural (and unnatural) history of hypertrophic obstructive cardiomyopathy*. Circ Res, 1974. 35(2): p. suppl II:179-95.
 134. McKenna, W.J., J.E. Deanfield, *Hypertrophic cardiomyopathy: an important cause of sudden death*. Arch Dis Child, 1984. 59(10): p. 971-5.
 135. Robinson, K., M.P. Frenneaux, B. Stockins, et al., *Atrial fibrillation in hypertrophic cardiomyopathy: a longitudinal study*. J Am Coll Cardiol, 1990. 15(6): p. 1279-85.
 136. Kofflard, M.J., D.J. Waldstein, J. Vos, F.J. ten Cate, *Prognosis in hypertrophic cardiomyopathy observed in a large clinic population*. Am J Cardiol, 1993. 72(12): p. 939-43.
 137. Geisterfer-Lowrance, A.A., S. Kass, G. Tanigawa, et al., *A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation*. Cell, 1990. 62(5): p. 999-1006.
 138. Niimura, H., K.K. Patton, W.J. McKenna, et al., *Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy of the elderly*. Circulation, 2002. 105(4): p. 446-51.
 139. Watkins, H., D. Conner, L. Thierfelder, et al., *Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy*. Nat Genet, 1995. 11(4): p. 434-7.
 140. Watkins, H., A. Rosenzweig, D.S. Hwang, et al., *Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy*. N Engl J Med, 1992. 326(17): p. 1108-14.
 141. Navarro-Lopez, F., *Hypertrophic cardiomyopathy. Genetic basis and clinical implications*. Rev Esp Cardiol, 2004. 57 Suppl 1: p. 22-32.
 142. Carrier, L., G. Bonne, E. Bahrend, et al., *Organization and sequence of human cardiac myosin binding protein C gene (MYBPC3) and identification of mutations predicted to produce truncated proteins in familial hypertrophic cardiomyopathy*. Circ Res, 1997.

- 80(3): p. 427-34.
143. Maron, B.J., W.J. McKenna, G.K. Danielson, et al., *American College of Cardiology/European Society of Cardiology Clinical Expert Consensus Document on Hypertrophic Cardiomyopathy. A report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines*. Eur Heart J, 2003. 24(21): p. 1965-91.
144. Richard, P., P. Charron, L. Carrier, et al., *Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy*. Circulation, 2003. 107(17): p. 2227-32.
145. Binder, J., S.R. Ommen, B.J. Gersh, et al., *Echocardiography-guided genetic testing in hypertrophic cardiomyopathy: septal morphological features predict the presence of myofibrillar mutations*. Mayo Clin Proc, 2006. 81(4): p. 459-67.
146. Niimura, H., L.L. Bachinski, S. Sangwatanaroj, et al., *Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy*. N Engl J Med, 1998. 338(18): p. 1248-57.
147. St John Sutton, M. J., A. Epstein, *Hypertrophic cardiomyopathy--beyond the sarcomere*. N Engl J Med, 1998. 338(18): p. 1303-4.
148. Ramirez, C.D., R. Padron, *Familial hypertrophic cardiomyopathy: genes, mutations and animal models. A review*. Invest Clin, 2004. 45(1): p. 69-99.
149. Poetter, K., H. Jiang, S. Hassanzadeh, et al., *Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle*. Nat Genet, 1996. 13(1): p. 63-9.
150. Hamada, H., M.G. Petrino, T. Kakunaga, *Molecular structure and evolutionary origin of human cardiac muscle actin gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. 79(19): p. 5901-5.
151. Mogensen, J., I.C. Klausen, A.K. Pedersen, et al., *Alpha-cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy*. J Clin Invest, 1999. 103(10): p. R39-43.
152. Ching, Y.H., T.K. Ghosh, S.J. Cross, et al., *Mutation in myosin heavy chain 6 causes atrial septal defect*. Nat Genet, 2005. 37(4): p. 423-8.
153. Arad, M., B.J. Maron, J.M. Gorham, et al., *Glycogen storage diseases presenting as hypertrophic cardiomyopathy*. N Engl J Med, 2005. 352(4): p. 362-72.
154. Havndrup, O., M. Christiansen, B. Stoevring, et al., *Fabry disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy: genetic screening needed for establishing the diagnosis in women*. Eur J Heart Fail, 2010. 12(6): p. 535-40.
155. Mohiddin, S.A., Z.M. Ahmed, A.J. Griffith, et al., *Novel association of hypertrophic cardiomyopathy, sensorineural deafness, and a mutation in unconventional myosin VI (MYO6)*. J Med Genet, 2004. 41(4): p. 309-14.
156. Davis, J.S., S. Hassanzadeh, S. Winitzky, et al., *The overall pattern of cardiac contraction depends on a spatial gradient of myosin regulatory light chain phosphorylation*. Cell, 2001. 107(5): p. 631-41.
157. Bos, J.M., S.R. Ommen, M.J. Ackerman, *Genetics of hypertrophic cardiomyopathy: one, two, or more diseases?* Curr Opin Cardiol, 2007. 22(3): p. 193-9.
158. Tester, D.J., M.J. Ackerman, *Cardiomyopathic and channelopathic causes of sudden unexplained death in infants and children*. Annu Rev Med, 2009. 60: p. 69-84.
159. Rodriguez-Calvo, M.S., M. Brion, C. Allegue, L. Concheiro, A. Carracedo, *Molecular genetics of sudden cardiac death*. Forensic Sci Int, 2008. 182(1-3): p. 1-12.
160. Waldmuller, S., M. Muller, K. Rackebrandt, et al., *Array-based resequencing assay for mutations causing hypertrophic cardiomyopathy*. Clin Chem, 2008. 54(4): p. 682-7.
161. Fokstuen, S., R. Lyle, A. Munoz, et al., *A DNA resequencing array for pathogenic mutation detection in hypertrophic cardiomyopathy*. Hum Mutat, 2008. 29(6): p. 879-85.
162. Chiu, C., R.D. Bagnall, J. Ingles, et al., *Mutations in alpha-actinin-2 cause hypertrophic*

- cardiomyopathy: a genome-wide analysis*. J Am Coll Cardiol, 2010. 55(11): p. 1127-35.
163. Hershberger, R.E., Lindenfeld, J., Mestroni, L., Priori, C., Taylor, M., Towbin, J.A., *Genetic Evaluation of Cardiomyopathy - A Heart Failure Society of America Practice Guideline*. Journal of Cardiac Failure, 2009. 15(2): p. 83-97.
 164. Schwartz, P.J., S.G. Priori, C. Spazzolini, et al., *Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias*. Circulation, 2001. 103(1): p. 89-95.
 165. Moss, A.J., J.L. Robinson, L. Gessman, et al., *Comparison of clinical and genetic variables of cardiac events associated with loud noise versus swimming among subjects with the long QT syndrome*. Am J Cardiol, 1999. 84(8): p. 876-9.
 166. Ackerman, M.J., D.J. Tester, C.J. Porter, *Swimming, a gene-specific arrhythmogenic trigger for inherited long QT syndrome*. Mayo Clin Proc, 1999. 74(11): p. 1088-94.
 167. Priori, S.G., P.J. Schwartz, C. Napolitano, et al., *Risk stratification in the long-QT syndrome*. N Engl J Med, 2003. 348(19): p. 1866-74.
 168. Maron, B.J., C.E. Clark, R.E. Goldstein, S.E. Epstein, *Potential role of QT interval prolongation in sudden infant death syndrome*. Circulation, 1976. 54(3): p. 423-30.
 169. Schwartz, P.J., M. Stramba-Badiale, A. Segantini, et al., *Prolongation of the QT interval and the sudden infant death syndrome*. N Engl J Med, 1998. 338(24): p. 1709-14.
 170. McCormack, J., *The role of genetic testing in paediatric syndromes of sudden death: state of the art and future considerations*. Cardiol Young, 2009. 19 Suppl 2: p. 54-65.
 171. Skinner, J.R., S.K. Chung, D. Montgomery, et al., *Near-miss SIDS due to Brugada syndrome*. Arch Dis Child, 2005. 90(5): p. 528-9.
 172. Arnestad, M., L. Crotti, T.O. Rognum, et al., *Prevalence of long-QT syndrome gene variants in sudden infant death syndrome*. Circulation, 2007. 115(3): p. 361-7.
 173. Cronk, L., B. Ye, D. Tester, et al., *Identification of CAV3-encoded caveolin-3 mutations in sudden infant death syndrome*. Heart Rhythm, 2006. 3(5 (Supp)): p. S66-S67.
 174. Weese-Mayer, D.E., M.J. Ackerman, M.L. Marazita, E.M. Berry-Kravis, *Sudden Infant Death Syndrome: review of implicated genetic factors*. Am J Med Genet A, 2007. 143A(8): p. 771-88.
 175. Van Norstrand, D.W., C.R. Valdivia, D.J. Tester, et al., *Molecular and functional characterization of novel glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) mutations in sudden infant death syndrome*. Circulation, 2007. 116(20): p. 2253-9.
 176. Brion, M., C. Allegue, R. Gil, et al., *Involvement of hypertrophic cardiomyopathy genes in sudden infant death syndrome (SIDS)*. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 2 2009: p. 495-496.
 177. Dettmeyer, R.B., R. Kandolf, *Cardiomyopathies--misdiagnosed as Sudden Infant Death Syndrome (SIDS)*. Forensic Sci Int, 2010. 194(1-3): p. e21-4.
 178. Colan, S.D., S.E. Lipshultz, A.M. Lowe, et al., *Epidemiology and cause-specific outcome of hypertrophic cardiomyopathy in children: findings from the Pediatric Cardiomyopathy Registry*. Circulation, 2007. 115(6): p. 773-81.
 179. Zahka, K., K. Kalidas, M.A. Simpson, et al., *Homozygous mutation of MYBPC3 associated with severe infantile hypertrophic cardiomyopathy at high frequency among the Amish*. Heart, 2008. 94(10): p. 1326-30.
 180. Medeiros-Domingo, A., P. Iturralde-Torres, M.J. Ackerman, *Clinical and genetic characteristics of long QT syndrome*. Rev Esp Cardiol, 2007. 60(7): p. 739-52.
 181. Wilde, A.A., C. Antzelevitch, M. Borggrefe, et al., *Proposed diagnostic criteria for the Brugada syndrome: consensus report*. Circulation, 2002. 106(19): p. 2514-9.
 182. McKenna, W.J., P. Spirito, M. Desnos, O. Dubourg, M. Komajda, *Experience from clinical genetics in hypertrophic cardiomyopathy: proposal for new diagnostic criteria in adult members of affected families*. Heart, 1997. 77(2): p. 130-2.

183. Oeth, P., G. del Mistro, G. Marnellos, T. Shi, D. van den Boom, *Qualitative and quantitative genotyping using single base primer extension coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MassARRAY)*. *Methods Mol Biol*, 2009. 578: p. 307-43.
184. Morcillo-Suarez, C., J. Alegre, R. Sangros, et al., *SNP analysis to results (SNPator): a web-based environment oriented to statistical genomics analyses upon SNP data*. *Bioinformatics*, 2008. 24(14): p. 1643-4.
185. P. Brugada, J. Brugada, Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report, *J. Am. Coll. Cardiol.* 20 (1992) 1391-1396.